






**A PROCESS FOR THE PREPARATION OF LIPASE****Publication number:** JP7504561T**Publication date:** 1995-05-25**Inventor:****Applicant:****Classification:**

**- international:** C12N15/09; C07K14/21; C12N1/21; C12N9/20;  
C12N15/00; C12N15/55; C12P19/38; C12R1/07;  
C12R1/19; C12R1/38; C12N15/09; C07K14/195; C12N;  
C12N1/21; C12N9/18; C12N15/00; C12N15/55;  
C12P19/00; (IPC1-7): C12N15/09; C12N1/21;  
C12N9/20; C12P19/38; C12N15/09; C12R1/07;  
C12N1/21; C12R1/19; C12N9/20; C12R1/38

**- European:** C07K14/21; C12N9/20

**Application number:** JP19920510426D 19921218**Priority number(s):** WO1992DK00391 19921218; WO1991DK00402  
19911220**Also published as:**

 WO9313200 (A)  
 EP0681609 (A1)  
 US5681715 (A1)  
 FI942907 (A)  
 EP0681609 (A0)

**Report a data error he**

Abstract not available for JP7504561T

Abstract of corresponding document: **WO9313200**

A process for producing an active lipase enzyme in vitro, comprising mixing an inactive or partly active lipase enzyme with a chaperone molecule and subjecting the mixture to denaturation followed by renaturation to produce the active lipase enzyme.

.....  
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-504561

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)5月25日

(51) Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
1/21		8828-4B	
9/20		8827-4B	
		9281-4B	
			C 1 2 N 15/ 00 Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00 Z N A A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願平5-510426	(71) 出願人	ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ ブ
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)12月18日		デンマーク国, デーコー-2880 バグスバ エルト, ノボ アレ (番地なし)
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)6月20日	(72) 発明者	ヨルゲンセン, ステーン トレールス
(86) 国際出願番号	P C T / D K 9 2 / 0 0 3 9 1		デンマーク国, デーコー-3450 アレレー ズ, ブルヌスバイ 5
(87) 国際公開番号	W O 9 3 / 1 3 2 0 0	(72) 発明者	ディデリフセン, ボエルゲ クラグ
(87) 国際公開日	平成5年(1993)7月8日		デンマーク国, デーコー-3460 ビルケレ ーズ, フグレサンスバイ 4
(31) 優先権主張番号	P C T / D K 9 1 / 0 0 4 0 2	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)
(32) 優先日	1991年12月20日		
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), BR, CA, FI, JP, K R, US		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リパーゼの製造のための方法

(57) 【要約】

インビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための方法であって、不活性又は部分的に活性なリパーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせ、次いでこの混合物を変性、それに続いて再生に付して活性リパーゼ酵素を生成せしめることを含んで成る方法。

## 請求の範囲

1. インビトロで活性リパーゼを製造するための方法であって
    - (a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリパーゼが不活性又は部分的に活性な状態で生産されるのに適する条件のもとで培養し、その培養物からこのリパーゼ酵素を回収し、次いでその回収されたリパーゼ酵素を活性に付する、
    - (b) 工程(a)で得られたこの活性したリパーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして
    - (c) 工程(b)の混合物を再生に付して、活性リパーゼ酵素を生成すること、
 を含んで成る方法。
  2. インビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための方法であって、
    - (a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリパーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で生産されるのに適する条件のもとで培養し、次いでそのリパーゼ酵素をこの培養物から回収する、
    - (b) この回収されたリパーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして
    - (c) 工程(b)の混合物を活性、それに続く再生に付して、活性リパーゼ酵素を生成すること、
 を含んで成る方法。
  3. 前記シャペロン分子が、このシャペロン分子をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、このシャペロン分子が生産されるのに適する条件のもとで培養し、次いでこの培養物からそ
- 
9. 前記のリパーゼ酵素をエンコードするDNA配列に、バチルス スチアロサーモフィルス マルトジェニクアミラーゼ遺伝子、バチルス リジェニホルミス  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエンス  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、バチルス スブチリス アルカリンプロテアーゼ遺伝子もしくはバチルス アミリス キシロシダーゼ遺伝子のプロモーターが、又はファージラムダP<sub>1</sub>もしくはP<sub>1</sub>プロモーター、ファージ17遺伝子10プロモーター、又は大腸菌lacプロモーターが先行している、請求項8に記載の方法。
  10. 前記リパーゼ酵素をエンコードするDNA配列に、バチルス スチアロサーモフィルス マルトジェニク遺伝子、バチルス リジェニホルミス  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエンス  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、バチルス スブチリス アルカリンプロテアーゼ遺伝子、バチルス アミリス キシロシダーゼ遺伝子、ファージ17遺伝子又は大腸菌lac遺伝子のリボソーム結合部位が先行している、請求項8に記載の方法。
  11. 前記リパーゼ酵素が細胞内で高収率で生産される、請求項1-10のいずれか1項に記載の方法。
  12. 前記リパーゼ酵素が封入体の形態で生産される、請求項11に記載の方法。
  13. 前記シャペロン分子がシェードモナス リパーゼ調節因子又はその誘導体である、請求項1-5のいずれか1項に記載の方法。
  14. 前記シャペロン分子が、シェードモナス セバシア リパーゼ調節因子、シェードモナス グルメ リパーゼ調節因子、シェードモナス アエルギノザ リパーゼ調節因子又はそれらの誘導体より成る群から選ばれる、請求項13に記載の方法。
  15. 前記シャペロン分子の生産のための宿主細胞が大腸菌である、請求項3に記載の方法。

のシャペロン分子を回収することによって生成されたものである、請求項1又は2に記載の方法。

4. 前記シャペロン分子が、工程(b)において活性リパーゼに加えられる前に変性処理に付されている、請求項1-3のいずれか1項に記載の方法。

5. インビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための方法であって

(a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA配列及びシャペロン分子をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリパーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で生産されるのに適する条件のもとで培養し、次いでリパーゼ酵素シャペロン分子混合物をこの培養物から回収する、

(b) 任意的にこの混合物への更なる量のシャペロン分子の添加を伴って、工程(a)の混合物を活性、それに続く再生に付し、活性リパーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る方法。

6. 前記リパーゼ酵素がシェードモナス種又はクロモバクター種に由来するものである、請求項1-5のいずれか1項に記載の方法。

7. 前記リパーゼ酵素が、シェードモナス セバシア、シェードモナス フラグ、シェードモナス グラジオリ、シェードモナス フルオレセンス、シェードモナス スクツェリ、シェードモナス アルカリゲンス、シェードモナス シェードアルカリゲンス、シェードモナス ブチダ、シェードモナス グルメ、シェードモナス アエルギノザもしくはクロモバクター ビスコスムのリパーゼ、又は前記のリパーゼ酵素の誘導体である、請求項6に記載の方法。

8. リパーゼ酵素の生産のために前記の宿主細胞が大腸菌である、請求項1-7のいずれか1項に記載の方法。

16. 前記のシャペロン分子をエンコードするDNA配列に、バチルス スチアロサーモフィルス マルトジェニクアミラーゼ遺伝子、バチルス リジェニホルミス  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエンス  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、バチルス スブチリス アルカリンプロテアーゼ遺伝子もしくはバチルス アミリス キシロシダーゼ遺伝子のプロモーターが、又はファージラムダP<sub>1</sub>もしくはP<sub>1</sub>プロモーター、ファージ17遺伝子10プロモーター、又は大腸菌lacプロモーターが先行している、請求項15に記載の方法。

17. 前記シャペロン分子をエンコードするDNA配列に、バチルス スチアロサーモフィルス マルトジェニク遺伝子、バチルス リジェニホルミス  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエンス  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、バチルス スブチリス アルカリンプロテアーゼ遺伝子、バチルス アミリス キシロシダーゼ遺伝子、ファージ17遺伝子又は大腸菌lac遺伝子のリボソーム結合部位が先行している、請求項15に記載の方法。

18. 前記シャペロン分子が細胞内で高収率で生産される、請求項13-17のいずれか1項に記載の方法。

19. 前記リパーゼ酵素がシェードモナス セバシア リパーゼであり、そして一方、前記シャペロン分子がシェードモナス セバシア リパーゼ調節因子である、請求項1-18のいずれか1項に記載の方法。

20. DNA構築体であって、シャペロン分子をエンコードする第二DNA配列にリパーゼ酵素をエンコードする第一DNA配列が、そのリパーゼ酵素及びシャペロン分子又はその機能的一部がこのDNA構築体で形質転換された適当な宿主細胞を培養することで単一の融合タンパク質として発現されるように融合してその第一DNA配列を含

んで成るDNA構築体。

21. 前記リパーゼ酵素をエンコードする第一DNA配列がシュードモナス種又はクロモバクター種に由来するものである、請求項20に記載のDNA構築体。

22. 前記第一DNA配列が、シュードモナス セバシア、シュードモナス フラギ、シュードモナス グラジオリ、シュードモナス アルカリゲンス、シュードモナス スタツツェリ、シュードモナス アルカリゲンス、シュードモナス シュードアルカリゲンス、シュードモナス プチダ、シュードモナス グルメ、シュードモナス アエルギノザもしくはクロモバクター ビスコスのリパーゼ、又は前記のリパーゼ酵素の誘導体をコードするものである、請求項21に記載のDNA構築体。

23. 前記第二DNA配列が、シュードモナス リパーゼ調節因子又はその誘導体をエンコードするものである、請求項20に記載のDNA構築体。

24. 前記第二DNA配列が、シュードモナス セバシア リパーゼ調節因子、シュードモナス グルメ リパーゼ調節因子、シュードモナス アエルギノザ 調節因子又はそれらの誘導体をエンコードするものである、請求項23に記載のDNA構築体。

25. 前記第一DNA配列が、シュードモナス セバシア リパーゼ又はその誘導体をエンコードし、そして他方、前記第二DNA配列がシュードモナス セバシア リパーゼ調節因子又はその誘導体をエンコードする、請求項20-24のいずれか1項に記載のDNA構築体。

26. 本明細書に添付のSEQ ID NO.7 に示す配列を有する請求項25に記載のDNA構築体。

27. 請求項20-26のいずれか1項に記載のDNA構築体を含んで成る組換え発現ベクター。

生成すること、

を含んで成る方法。

34. リパーゼ酵素の変性及び再生処理のための方法であって、

a) 変性及び再生処理に付するべきリパーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして

b) 工程a)の混合物を変性、それに続く再生に付して、活性リパーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る方法。

28. 請求項20-26のいずれか1項に記載のDNA構築体又は請求項27に記載の組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

29. 大腸菌の株の細胞である、請求項28に記載の宿主細胞。

30. 前記DNA構築体に、パチルス スチアロサーモフィルス マルトジェニクアミラーゼ遺伝子、パチルス リシェニホルミス α-アミラーゼ遺伝子、パチルス アミロリケファシエンス α-アミラーゼ遺伝子、パチルス スブチリス アルカリンプロテアーゼ遺伝子もしくはパチルス プニルス キシロシダーゼ遺伝子のプロモーターが、又はファージラムダP<sub>1</sub>もしくはP<sub>1</sub>プロモーター、ファージT7遺伝子10プロモーター、又は大腸菌lacプロモーターが先行している、請求項28に記載の宿主細胞。

31. 前記DNA構築体に、パチルス スチアロサーモフィルス マルトジェニク遺伝子、パチルス リシェニホルミス α-アミラーゼ遺伝子、パチルス アミロリケファシエンス α-アミラーゼ遺伝子、パチルス スブチリス アルカリンプロテアーゼ遺伝子、パチルス プニルス キシロシダーゼ遺伝子、ファージT7遺伝子又は大腸菌lac遺伝子のリボソーム結合部位が先行している、請求項29に記載の宿主細胞。

32. 活性状態におけるリパーゼを製造するための方法であって、リパーゼを生産するのに適する条件のもとで請求項28-31のいずれか1項に記載の宿主細胞を培養し、そしてこの培養物からリパーゼを回収することを含んで成る方法。

33. リパーゼ酵素を変性及び再生する方法であって、

(a) リパーゼ酵素を変性処理に付する、

(b) 工程(a)において得られた変性リパーゼ酵素を、任意的に変性処理に付しておいたシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして

(c) 工程(b)の混合物を再生に付して、活性リパーゼ酵素を

#### 明 細 書

リパーゼの製造のための方法

#### 発明の分野

本発明は、インビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための方法、リパーゼをエンコードするDNA構築体、このDNA構築体を含む組換えベクター、及びこのベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

#### 発明の背景

リパーゼは、トリグリセリドの中のエステル結合の加水分解を触媒して、ジグリセリド、モノグリセリド、グリセリン及び遊離脂肪酸の形成をもたらしめる酵素である。一部のリパーゼはエステル結合にかかわっているその他の反応、例えばエステル結合の合成又はエステル交換反応も触媒する。リパーゼは幅広く様々な生物により生産される。特に微生物リパーゼは、食品産業及び洗剤の如きの脂肪のリポ分解が期望されている様々な目的にとって実用的にかなり有用である。

市販からの脂肪のしみ又は汚れの除去のための洗剤の中に含まれるのに特に好都合であると見出されているある特定のリパーゼは、シュードモナス セバシア (*Pseudomonas cepacia*)の株により生産されるリパーゼである。EP214751号において(Novo Industri A/S)、このリパーゼは60℃以下の温度で活性であるリパーゼとして開示されており、これは重要であり、なぜなら最近市販は60℃以下の温度で洗浄されているからである。

洗剤添加剤として利用するのに別の重要なシュードモナス セバシア リパーゼは、W089/01032 (Novo Industri A/S)において部位

非特異性リパーゼとして開示されているもの、即ち、トリグリセリドの3個の脂肪アシル基全てと反応できるものである。

シェードモナス セバシア リパーゼ生産を助長するために、組織DNA 技術を、例えば酵素をエンコードするDNA 配列を発現せしめる強力なプロモーターを導入することにより、又はより効率的なリボソーム結合部位もしくはシグナルペプチドコード配列を導入することによりリパーゼ発現を最適化するために、あるいは酵素の生産のための、培養し易い(例えば菌の生産性生物、例えば大腸菌を運ぶこと)又は高めのリパーゼ収率をもたらせる宿主生物を運ぶために、採用することが好都合でありうる。

しかしながら、以下に説明する通り、かかる手法は時折予測の結果を得ることに失敗することが、例えば菌のタンパク質をコードする構造遺伝子の他に1又は複数の遺伝子がその遺伝子生成物の生産にある程度の役割を担っているときのケースにおいてありうる(かかる遺伝子の例は、バチルス (*Bacillus*) の*ase* 及び*lep* 遺伝子、並びにクレプシウラ (*Clebsiella*) アルブナーゼ及び大腸菌ヘモリシンの生産にとって必要な遺伝子である)。

別のシェードモナスの種、シェードモナス フラギ (*Pseudomonas fragi*)からのリパーゼ遺伝子のクローニングは、例えばS. Aoyamaら(1988)及びM. Euglinyaら(1986)より公知となっている。しかしながら、P. フラギより生産されるリパーゼは、P. セバシアより生産されるそれとはそのアミノ酸配列において相違しており、そしてこれらの文獻において、宿主生物の中で有意な量のリパーゼの生産を進めめるのに1又は複数の異なる遺伝子が必要でありうることの示唆はない。

EP331376号は、シェードモナス セバシア リパーゼをエンコードする組織DNA 及びこのリパーゼの生産にかかわるタンパク質を開

示する。

N090/00908号は、宿主細胞の中で発現されるポリペプチドによる異種宿主細胞におけるシェードモナス セバシア リパーゼの生産を開示しており、そのポリペプチドはリパーゼ生産の調節因子として働いている。

#### 発明の要旨

驚くべきことに、組織宿主細胞により生産される活性リパーゼ酵素の収率は、その細胞から回収されたリパーゼを変性、それに続くシャペロン(chaperone)分子の存在下での再生に付したときに高めることが可能であることが見出された。

従って、本発明はインビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための方法に関連し、この方法は

(a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA 配列で形質転換された宿主細胞を、そのリパーゼが不活性又は部分的に活性な状態で生産されるのに適する条件のもとで培養し、その培養物からこのリパーゼ酵素を回収し、次いでその回収されたリパーゼ酵素を変性に付する、

(b) この変性したリパーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせ、そして

(c) 工程(b)の混合物を再生に付して、活性リパーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

他方、本発明はインビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための方法に関連し、この方法は

(a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA 配列で形質転換された宿主細胞を、そのリパーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で

生産されるのに適する条件のもとで培養し、次いでそのリパーゼ酵素をこの培養物から回収する、

(b) この回収されたリパーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして

(c) 工程(b)の混合物を変性、それに続く再生に付して、活性リパーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

異なる態様において、本発明はインビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための方法に関連し、この方法は

(a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA 配列及びシャペロン分子をエンコードするDNA 配列で形質転換された宿主細胞を、そのリパーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で生産されるのに適する条件のもとで培養し、次いでリパーゼ酵素シャペロン分子混合物をこの培養物から回収する、

(b) 任意的にこの混合物への異なる量のシャペロン分子の添加を伴って、工程(a)の混合物を変性、それに続く再生に付し、活性リパーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

上述した通り、本発明は、タンパク質又はタンパク質複合体の天然のコンホメーションが常にそのタンパク質のアミノ酸配列によってのみ決定されるわけではないことの発見に基づいている。従って、あるケースにおいては、シャペロン分子と呼ばれているアクセサリタンパク質が別のタンパク質又はタンパク質複合体の適正なる三次構造の形成を仲介するのに必要であるが、それら自体は最終機能構造体の成分ではない(Billaら、1991)。

本明細書において、「シャペロン分子」なる語は、かかるアクセサリタンパク質、即ち、他のポリペプチドのそのほどこれた状態

の保持を助長することに、その適正なトランスメンブラン標的化又は折りたたみ及びオリゴマー形成を可能とすることに、並びにタンパク質複合体の解離にかかわるタンパク質を意味することを意図している(R. J. BillaとS. H. Hemmingsen(1989), J. E. Rothman(1989), Morimotoら(1990)を参照のこと)。一般に、標的タンパク質又はタンパク質複合体の共有修飾はシャペロン分子の作用によっては観察されていないが、本発明の方法において用いるシャペロン分子がかかる共有修飾を及ぼしめることが可能であることを排除することはできない。従って、本明細書で用いている「シャペロン分子」なる語は、リパーゼ酵素の非共有及び共有修飾を及ぼしめるシャペロン分子を包括することを意図している。

別の観点において、本発明は、リパーゼ酵素をエンコードする第一DNA 配列を含んで成るDNA 構築体に関連し、この第一DNA 配列は、シャペロン分子をエンコードする第二DNA 配列に、このリパーゼ酵素及びシャペロン分子又はそれらの機能性部分が、そのDNA 構築体で形質転換された適当な宿主細胞の培養に基づき、単一の融合タンパク質として発現されるような状況で融合されている。

#### 発明の詳細な開示

前述の工程(b)における回収及び任意的に変性されたリパーゼ酵素に添加すべきシャペロン分子は、シャペロン分子をエンコードするDNA 配列で形質転換された宿主細胞をそのシャペロン分子を生成するのに適する条件のもとで培養し、次いでそのシャペロン分子をその培養物から回収することを含んで成る方法によって生成されることが好都合である。更に、変性リパーゼ酵素にシャペロン分子を添加するとき、そのシャペロン分子自体が変性していることが好都合でありうる。従って、本発明の方法は、シャペロン分子を工程(b)

における変性リパーゼ酵素と混ぜ合わせる前に、それを変性処理に付する更なる工程を含んで成りうる。

本発明書において、リパーゼ酵素について用いている「部分的に活性な状態」とは、リパーゼが、例えば後述するpHスタートを利用する力価決定による活性測定による決定に従い、完全ではないがある程度の活性を有することを意味していることを意図している。完全より劣る活性とは、その部分的に活性なリパーゼ調製品が、完全活性リパーゼタンパク質の対応の調製品に比して低い比較性を有する意味としてとられる（この二つの調製品は、純度が同じリパーゼタンパク質を含む）。

不活性又は部分的に活性なリパーゼ酵素及び任意的なシャペロン分子の混合物（これは、本発明の方法に従い、別々に、又はこの2種の成分の混合物に基づいて実施される）は公知の方法で実施される。例えば、その変性は、その混合物を変性剤（例えば8Mの尿素）の作用に付し、次いでその変性剤を例えば透析により除去することによって獲得される。

本発明の方法による製造にとって好適なリパーゼは、シェードモナス種又はクロモバクター (*Chromobacter*) 種に由来する。特に、このリパーゼ酵素は、シェードモナス セバシア、シェードモナス フラギ、シェードモナス グラジオリ (*Pseudomonas gladioli*)、シェードモナス フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シェードモナス スタッツェリ (*Pseudomonas stutzeri*)、シェードモナス アルカリゲンス (*Pseudomonas alcaligenes*)、シェードモナス シュードアルカリゲンス (*Pseudomonas pseudocaligenes*)、シェードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*)、シェードモナス グルメ (*Pseudomonas glumae*)（例えばEP407225に記載）、シェードモナス アエルギノザ (*Pseudomonas aeruginosa*)、もしくは

リケンフォルミ、バチルス レンスタス (*Bacillus lentus*)、バチルス ブレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス アルカロフィルス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルス アミロリケファシエン (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス コアセラシス (*Bacillus coagulans*)、バチルス サーキュラリス (*Bacillus circulans*)、バチルス ラクタス (*Bacillus lactus*)又はスレプトマイセス リビダス (*Streptomyces lividans*)でありうる。大腸菌は高効率の、即ち細胞タンパク質の少なくとも5%の（細胞内）リパーゼを生産することができ、従って好適な宿主生物である。大腸菌において、リパーゼ酵素は封入体（inclusion bodies）の状態で生産されるのが典型的である。細菌の形質転換は例えばプロトプラストの形質転換により、又はコンピテント細胞の利用により、公知の方法で行われる。その他の適当な細菌宿主細胞は、シェードモナス種の細菌、例えばシェードモナス セバシア、シェードモナス フラギ、シェードモナス グラジオリ、シェードモナス フルオレセンス、シェードモナス スタッツェリ、シェードモナス アルカリゲンス、シェードモナス シュードアルカリゲンス、シェードモナス プチダ、シェードモナス グルメ又はシェードモナス アエルギノザの細胞である。

他方、宿主細胞は菌類、即ち酵母又は糸状菌類の細胞でありうる。この酵母宿主細胞は例えばサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属の細胞、例えばS. セレビジエ (*S. cerevisiae*)でありうる。糸状菌類の宿主生物は好適には組織タンパク質を生産するのに従来から宿主として利用されてきたもの、例えばアスペルギルス (*Aspergillus*) 種の株、例えばA. ニガハ (*A. niger*)、A. ニドウラン (*A. nidulans*) 又はA. オリザ (*A. oryzae*)でありうる。菌類の宿主細胞

ロモバクター ビスコス (*Chromobacter viscosus*) リパーゼ、又は前記リパーゼ酵素の誘導体でありうる。特に、リパーゼ酵素はシェードモナス セバシアの株、例えばEP214761号に開示の発明に関連してドイツのサムルンク フォン ミクロオルガニズメンに寄託されている寄託番号DSM 3333-3337 及びDSM 3401の株、並びに、W089/01302に開示されている発明に関連してドイツのサムルンク フォン ミクロオルガニズメンに寄託されている寄託番号DSM 3959の株に由来するものである。

本発明書において、「誘導体」なる語は、天然のリパーゼから、その天然リパーゼをコードするDNA配列を適宜改変せしめ、その天然タンパク質のC-及びN-末端のいずれか又は両者に1又は複数のアミノ酸を付加を得ること、天然アミノ酸配列における1又は複数の異なる部位において1又は複数のアミノ酸の置換を得ること、天然タンパク質の末端のいずれかもしくは両者において、又はそのアミノ酸配列の中の1又は複数の部位において欠失を得ること、あるいは天然アミノ酸配列における1又は複数の部位において1又は複数の挿入を得ること、により誘導された、リパーゼ活性を有するタンパク質を意味することを意図する。天然タンパク質についてコードするDNAのかかる修飾はよく知られており、そして当業界において幅広く実施されている。典型的には、この誘導体のアミノ酸配列は、天然リパーゼタンパク質のそれと相溶性である、即ち、例えばかなりの度合いの相溶性を示すか、又はその誘導体は、その天然リパーゼに対して発生せしめた抗体と反応するであろう。

本発明の方法において用いられる宿主細胞はあらゆる適当な細菌であって、培養により大量のリパーゼを生産するものでありうる。適当な細菌の例にはグラム陽性細菌、例えばバチルス スプテリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス リシエニホルミス (*Bacillus*

細胞を形質転換するのに及び組織タンパク質の発現を獲得するのに利用されている技術はEP238023号に記載されているものが適当でありうる。

宿主細胞の中でのタンパク質の発現にとって、このタンパク質をエンコードするDNA配列にプロモーターが先行してよい。このプロモーターは選ばれた宿主の中で強力な転写活性を示すあらゆるDNA配列であってよく、そして細胞外又は細胞内タンパク質、例えばアミラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ又は解糖酵素をエンコードする遺伝子に由来しうる。

タンパク質の発現にかかわるその他の配列には、終止及びポリアダニル化配列、並びにリボソーム結合部位が含まれ、そしてプロモーターと同じ起源に由来するのが適当でありうる。

本発明の方法において、リパーゼ酵素及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列には、バチルス ステアロサーモフィルス マルトジェニック アミラーゼ遺伝子、バチルス リシエニホルミス α-アミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエン α-アミラーゼ遺伝子、バチルス スプテリス アルカリンプロテアーゼ遺伝子、もしくはバチルス アミリス キシロシダーゼ遺伝子のプロモーターが、又はファージラムダP<sub>1</sub>もしくはP<sub>2</sub>プロモーター、ファージT7遺伝子10プロモーターもしくは大腸菌lacプロモーターが先行しているのが好都合である。リパーゼ酵素及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列には、バチルス ステアロサーモフィルス マルトジェニック アミラーゼ遺伝子、バチルス リシエニホルミス α-アミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエン α-アミラーゼ遺伝子、バチルス スプテリス アルカリンプロテアーゼ遺伝子、バチルス アミリス キシロシダーゼ遺伝子、ファージT7遺伝子10又は大腸菌lac遺伝子の

リボソーム結合部位が先行してよい。

本発明に従うと、シャペロン分子はシェードモナス リパーゼ調節タンパク質、好ましくはシェードモナス セバシア リパーゼ調節因子 (W090/00908号に開示)、シェードモナス グルメ リパーゼ調節因子及びシェードモナス アエルギノーズ リパーゼ調節因子より成る群から選ばれるもの、又は任意のかかるリパーゼ調節因子の誘導体であることが好都合である。

本明細書において、リパーゼ調節因子の誘導体は、リパーゼ酵素の誘導体に関して上記したのと同じ状況である、即ち、前記の通りに、天然リパーゼ調節因子についてコードするDNA配列を適宜改変することにより天然リパーゼから誘導されたシャペロン活性を有するタンパク質であると理解される。この誘導体のシャペロン活性は、例えば本明細書に記載の通り、活性リパーゼ酵素の生産におけるその誘導体の能力の分析により決定される。

本発明にかかる方法の好適な態様において、リパーゼ酵素はシェードモナス セバシア リパーゼ又はその誘導体であり、そしてシャペロン分子はシェードモナス セバシア リパーゼ調節因子 (又はその誘導体) でありうる (共に、W090/00908号に開示)。

リパーゼ酵素及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列を含んで成る本発明のDNA構築体はゲノム又はcDNA起源であってよく、例えば適当な生物のゲノム又はcDNAライブラリーを用意し、そしてリパーゼ又はシャペロンの全体又は一部をコードするDNA配列を、標準の技術に従う (Sambrookら、1989を参照のこと) 合成オリゴヌクレオチドアプローブを用いるハイブリダイゼーションによりスクリーニングすることによって得られるものである。

本発明のDNA構築体は確立されている標準的な方法、例えばS. L. Beaucageら (1981)、Matthaeusら (1984) により述べられているホ

スホアミジット法により合成的に製造することもできる。ホスホアミジット法に従うと、オリゴヌクレオチドを例えば自動DNA合成装置で合成し、精製、リゲートそして適宜のベクターの中にクローンする。

最後に、このDNA構築体は合成とゲノムとの複合物、合成とcDNAとの複合物、又はゲノムとcDNAとの複合物であって、合成、ゲノム又はcDNA起源のフラグメント (適宜) を、この全DNA構築体の様々な部分に対応するフラグメントに、標準の技術に従ってリゲートすることによって製造したものでありうる。

本発明のDNA構築体において、リパーゼ構築体をエンコードするDNA配列はシェードモナス種又はクロモバクター種に由来するものであってよい。例えば、前記第一DNA配列は、シェードモナス セバシア、シェードモナス フラギ、シェードモナス グラジオリ、シェードモナス フルオレセン、シェードモナス スタツツェリ、シェードモナス アルカリゲンス、シェードモナス シェードアルカリゲンス、シェードモナス アチダ、シェードモナス グルメ、シェードモナス アエルギノーズもしくはクロモバクター ビスコス リパーゼ、又は上記のリパーゼ酵素の誘導体をエンコードするものでありうる。前記第二DNA配列は、シェードモナス セバシア リパーゼ調節因子、シェードモナス グルメ リパーゼ調節因子、シェードモナス アエルギノーズ リパーゼ調節因子、もしくはその他のシェードモナス リパーゼ調節因子タンパク質、又は任意のこれらの調節因子の誘導体をエンコードするものでありうる。最も好ましくは、この第一DNA配列はシェードモナス セバシア リパーゼ又はその誘導体をエンコードし、そして第二DNA配列は引用することで本明細書に組入れるW090/00908号に記載のシェードモナス セバシア リパーゼ調節因子又はそれらの誘導体をエンコー

ドする。

特に好適なDNA構築体は本明細書に添付したSBQ ID No.5に示す配列を有するものである。この配列は常用の方法に従って改変されてよい。このDNA配列の適当な改変の例は、ヌクレオチド置換であって、リパーゼ又はリパーゼ調節因子のアミノ酸配列を別のものにはしないが、そのDNA構築体を導入する宿主生物のコドン用法に対応しうる置換、又はヌクレオチド置換であって、リパーゼもしくはリパーゼ調節因子のいずれもの性質を損うことなく、別のアミノ酸配列による、それ故、可能としては、別のポリペプチド構造にする置換である。その他の可能な改変の例は、配列への1又は複数のヌクレオチドの挿入、配列のいずれかの末端での1又は複数のヌクレオチドの付加、及び配列の末端又は配列内のいずれかの1又は複数のヌクレオチドの欠失である。

更なる観点において、本発明は前記のDNA構築体を含んで成る組織発現ベクターに関連する。リパーゼ及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列を保有する発現ベクターは、一定の宿主生物の中での自己複製可能な任意のベクター、典型的にはプラスミド又はバクテリオファージでありうる。ベクターにおいて、リパーゼ及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列は適当なプロモーター配列に作動連結しているべきである。このプロモーターは宿主細胞の中で転写活性を示す任意のDNA配列であってよく、そして宿主生物に対して同種又は異種のいずれものタンパク質をエンコードする遺伝子に由来しうる。このプロモーターは好ましくはバチルス ステアロサモフィルス マルトジェニク アミラーゼ遺伝子、バチルス リシニホルミス α-アミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエンス α-アミラーゼ遺伝子、バチルス スプチリス アルカリン プロテアーゼ遺伝子もしくはバチルス

アミリス キシロシダーゼ遺伝子のプロモーター、又はファージラムダP<sub>1</sub>、もしくはP<sub>1</sub>プロモーター、ファージT7遺伝子10プロモーター、又は大腸菌lacプロモーターである。

このベクターは選択マーカー、例えば遺伝子であってその生成物が抗生物質耐性、例えばアンピシリン、クロラムフェニコールもしくはテトラサイクリン耐性を授けるもの、又はβ、αブチリスもしくはβ、リシニホルミス由来のβ、α遺伝子も含んで成りうる。

更なる別の観点において、本発明は活性状態におけるリパーゼの製造方法に関連し、この方法は、上記のDNA構築体で形質転換された宿主細胞をこのリパーゼを生産するのに適する条件のもとで培養し、次いでこの培養物からリパーゼを回収し、任意的にこのリパーゼ/シャペロン融合タンパク質の酸性及び再生が後に続くことを含むことになる。

細胞の培養に用いられる培地は細菌の増殖にとって適当な任意の常用の培地でありうる。リパーゼはこの培地から、常用の手順、例えば、必要ならば細胞内生成物を回収するための細胞の破壊の後の遠心もしくは濾過により、塩、例えば硫酸アンモニウムによる上清液もしくは濾液のタンパク質成分の沈殿、それに続く様々なクロマトグラフィー手順、例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等による精製により、分離せしめることによって回収される。

活性リパーゼ酵素の調製におけるシャペロン分子の利用は組織DNA技術に関連して特に重要であるが (前記に説明した通り)、シャペロン分子の存在は、リパーゼ酵素の製造方法にかかわらず、本明細書記載の活性リパーゼ酵素が所望する任意の酸性及び再生処理に関連して重要である。従って、例えば酸性処理に付すべき天然又は遺伝子操作にかけられていない生物の常用の発酵により生産され



# 特表平7-504561 (7)

図9は例3に記載の通りに実施した大腸菌JA221において発現させたタンパク質のSDS-PAGE分析の結果を示し、ここでそれらのレーンは:

A & S	分子量マーカー: 45, 36, 24及び20		
B	pJW2 (ベクター)		
C	pSJ150 (pUC 中のオリジナルのリパーゼ構築体)		
D	pABE2	30℃	1.0 時間 (hr)
E	pABE2	42℃	1.0 hrs
F	pABE2	42℃	1.5 hrs
G	pABE2	42℃	2.0 hrs
H, M & R	P. セバシア由来の精製リパーゼ		
I	pABE10	30℃	1.0 hrs
J	pABE10	42℃	1.0 hrs
K	pABE10	42℃	1.5 hrs
L	pABE2	42℃	2.0 hrs
N	pCBE6	-IPTG	1.0 hrs
O	pCBE6	+IPTG	1.0 hrs
P	pCBE6	+IPTG	1.5 hrs
Q	pCBE6	+IPTG	2.0 hrs

図10はLip 抗体を利用した例3記載の通りに実施したイムノブロット分析の結果を示し、ここでレーンは:

るリパーゼ酵素に関して、その後の再生処理におけるシャペロン分子の存在は重要であると信じられている。

従って、更なる一般的な観点において、本発明はリパーゼ酵素を変性及び再生する方法に関連し、この方法は

a) リパーゼ酵素を変性処理に付する、

b) 工程 a) において得られた変性リパーゼ酵素を、任意的に変性処理に付しておいたシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして

c) 工程 b) の混合物を再生に付して、活性リパーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

従って、リパーゼ酵素の変性/再生処理は

a) 変性及び再生処理に付するべきリパーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして

b) 工程 a) の混合物を変性、それに続く再生に付して、活性リパーゼ酵素を生成すること、

により実施されうる。

## 図面の説明

本発明を、添付の図面を参考にしながら下記で説明する。ここで

図1はプラスミドpABE2を示し;

図2はプラスミドpABE8を示し;

図3はプラスミドpABE10を示し;

図4はプラスミドpCBE6を示し;

図5はプラスミドpCBE7を示し;

図6はプラスミドpCBE12を示し;

図7はプラスミドpCBE18を示し;

図8はプラスミドpCBE19を示し;

A	pJW2 (ベクター)		
B	pSJ150		
C	pABE2	30℃	1.0 hr
D	pABE2	42℃	1.0 hr
E	pABE2	42℃	1.5 hrs
F	pABE2	42℃	2.0 hrs
G, L, Q, S	P. セバシア由来の精製リパーゼ (10LU)		
H	pABE10	30℃	1.0 hr
I	pABE10	42℃	1.0 hr
J	pABE10	42℃	1.5 hrs
K	pABE10	42℃	2.0 hrs
M	pCBE6	-IPTG	1.0 hr
N	pCBE6	+IPTG	1.0 hr
O	pCBE6	+IPTG	1.5 hrs
P	pCBE6	+IPTG	2.0 hrs
R	pABE2 + pABE10, 42℃ 1.5 hrs;		

図11は、リパーゼのイムノブロット分析により決定されたP. セバシアの中でのLlmAの細胞所在 (図11a)、並びにP. セバシアの細胞内 (細胞質及び細胞内膜)、ペリプラズマ及び細胞外面分においてオレイルアルコールで誘発されたLlm (図11b) を示す。等量のタンパク質を、0.01, 17及び21%のそれぞれに対応する各レーンに添加した。(a)において (リパーゼ イムノブロット)、レーンは以下を含んでいた:

- A P. セバシア由来の精製リパーゼ
- B 細胞内面分
- C ペリプラズマ面分
- D 細胞外面分;

(b)において (Llm イムノブロット)、レーンは以下を含んでいた:

A pJ38より発現されたLlm

B 細胞内面分

C ペリプラズマ面分

D 細胞外面分;

図12はプラスミドpABE19を示し;

図13はプラスミドpABE22を示し;

図14はプラスミドpABE16を示し;

図15はプラスミドpABE23を示し;そして

図16はプラスミドpCBF1-6を示す。

本発明を下記の実施例で更に説明するが、これらは本発明の請求の範囲を限定することは意図しない。

## 方法および材料

**大腸菌** TG1 supE had-5 thi-(lac-proAB) F' [traD36proAB+lacI lacZ-M15] (Gibson, 1984)

**大腸菌** JA221 (Clarke and Carbon, 1978)

**大腸菌** BL21 (DE3) 8株リソゲン, placUV5-T7 RNAPol (IPTG 誘発性) (Studier, 1990)

プラスミド

pSJ150-Jorgensen et al. (1991)

pJW2-Wang et al. (1990)

pET3a-Rosenberg et al. (1987)

pT7-7-Stan Tabor, Dept. of Biol. Chem., Harvard Medical Schoolより入手

pLysE と pLysS-pACYC184::pTet及び対立配対由来のT7リソチーム (Studier, 1990)。

## 一般方法

標準DNA 操作は、本質的にSambrookら(1989)に記載の通りに実施した。

制限酵素、T<sub>4</sub> DNAリガーゼ、DNA ポリメラーゼ I (クレノウフラグメント) はBoehringer Mannheim 又はPromega より入手し、そしてその供給者の推奨の通りに用いた。

ニワトリ卵白リゾチームはSigma より入手した。

プラスミドの調製及び大腸菌の形質転換はSambrookら(1989)に記載の通りに実施した。

Sambrookら(1989)に記載の通りにSDS-ポリアクリルアミドゲルを用い、電気泳動し、そして染色した。

タンパク質分子量マーカーはSigma より購入した。

## リパーゼ分析

リパーゼ活性は、グリセロールトリブチレート又はオリーブ油エマルションのいずれかと、プリリアントグリーンを含むプレート上で検出した。リパーゼ活性は基質としてグリセロールトリブチレートをを用いてpH-スタット法により測定した。1 LU (リパーゼユニット) は、下記の条件のもとで1分当り1  $\mu$  moleの測定可能な産物を産生せしめる酵素の量である：

温度	30.0℃
pH	7.0
乳化剤	アラビアゴム、50ml/1 (Jorgensen ら、1991)。

リパーゼスクリーニングアッセイはマイクロタイターディッシュの中で下記の手順に従って実施した：

まず乳化試液を作る：

17.9 g のNaCl + 0.41 g のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 5.0 g のアラビアゴム + 540 ml

のグリセロールを、脱ミネラル水で1000mlの最終容量にする。

リパーゼアッセイ試液を下記の通りに作る：

12.5mlの上記の乳化試液+3.75mlのグリセロールトリブチレート+0.25mlのプリリアントグリーン (H<sub>2</sub>O 中で40mg/ml) + 50mlの10 mMのトリス pH 9.0 をUltra Turrax乳化器の中で1分間乳化させる。

実際のアッセイは、100 mlのこのアッセイ試液を100 mlのリパーゼサンプルと混合することにより実施する。発色を、既知のリパーゼサンプルのそれと比較した。

プリリアントグリーンプレートは15mlのLBアガーより成り、10%のオリーブ油エマルション0.3 mlと蒸留水中の40mg/mlのプリリアントグリーン溶液0.1 mlとを含む3 mlのLBアガーのトップ層を有する。オリーブ油エマルションは、オリーブ油10ml + アラビアゴム1 g + 脱イオン水90mlであり、Ultra Turrax乳化器を用いて混合した。高レベル発現のための大腸菌培養物の誘発

## (a) pH2をベースとするプラスミド

一夜培養物をオービタルシェーカーの中で250 rpm で30℃で増殖させ、1:100に希釈し、そして0.5のA600が達せられるまで30℃で3~4hr増殖させた。1組のデュプリケート培養物のうちの一方をタンパク質合成の誘発のために42℃に移した。両培養物からサンプルを、誘発後0, 30, 60, 90及び120分において取った。

## (b) pH7.3a/pH7.7をベースとするプラスミド

一夜培養物をオービタルシェーカーの中で250 rpm で30℃で増殖させ、1:50に希釈し、そして0.5のA600が達せられるまで30℃で増殖させた。1組のデュプリケート培養物のうちの一方にIPTGを1.5 mMの最終濃度となるまで加えた。IPTGの添加の15min後に、誘発培養物にリファシシンも100  $\mu$  g/mlの最終濃度となるように加えてよい。両培養物から、誘発後0, 30, 60, 90及び120分の時間

においてサンプルを取った。

## タンパク質サンプルの処理及び調製

サンプルを直ちに0℃に冷やした。細胞をマイクロ遠心機で12,000 g、5分、4℃での遠心により回収した。細胞ペレットをラエムリサンプルバッファの中に戻懸濁させ、そして-20℃に凍結した。タンパク質をその上清液から、等容量のアセトンの添加、及び氷上で30minの放置、それに続く15min、12,000 g、4℃での遠心により沈殿させた。沈殿タンパク質をラエムリサンプルバッファの中に戻懸濁し、そして-20℃で凍結した。

## SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるタンパク質の分析

タンパク質サンプルを、12%のSDS-ポリアクリルアミドゲルに載せる前に5 min 煮沸した。ゲルをトリス-グリシンの中で、染色先端がゲルの端に到達するまで電気泳動し、そして0.25%のクマジープリリアントブルーで染め、次いで10%の酢酸の中で染色した。ウェスタン分析

利用した方法は Towbin ら (1979) のそれと同等である。タンパク質サンプルを12%のSDS-ポリアクリルアミドゲルにおいて電気泳動し、そしてニトロセルロースに電気泳動的に転写させた。フィルターをブロッキングバッファとブレインキューベートし、次いで抗リパーゼ抗体とインキューベートした。次にアルカリホスファターゼコンジュゲート化、ヤギ抗-ウサギIgG (Sigma) をフィルターとインキューベートした。ニトロブルー-テトラゾリウムと5-ブローモ-4-クロロインドールホスフェート (共にSigma 由来) を用いてタンパク質を顕微化させた。

細胞溶解のための方法：Marston (1987)から採用

一夜培養物を100 mlのLB培地に1:100に希釈し、次いで0.5のOD600 値へと増殖させた。pAN2 及びpAN10のケースにおける熱に

よる、並びにpCB26 のケースにおけるIPTGによる誘発を2時間行った。その培養物を次に500 g で15分、4℃で遠心した。その上清液を除去し、そしてそのペレットを秤量した。大腸菌細胞の各グラム (ウェット重量) に対して3 mlの溶解バッファを加え、そしてそのペレットを再懸濁させた。溶解バッファは50 mMのトリス, Cl, 1 mMのEDTA, 100 mMのNaClを含んでいた。

細胞の各グラム当たり、8 mlの50 mMのPMSFストック及び80  $\mu$  lのリゾチーム (10mg/ml) を加え、そして20分攪拌した。4 mgのデオキシコール酸を細胞のグラム当りに連続攪拌しながら加えた。そのリゼートを37℃に置き、そしてガラス棒で攪拌した。そのリゼートが粘稠となったら、20  $\mu$  lのDNAase I (1mg/ml) を細胞のグラム当りに加えた。そのリゼートをもはや粘稠でなくなるまで室温で放置した (約30分)。そのリゼードを次いで必要となるまで4℃で保存した。

針入体の精製及び洗浄：(Marston ら、1984)

細胞リゼートを12,000 g、15分、4℃で遠心した。その上清液をデカントし、そしてそのペレットを、0.5%のトリトン及び10 mMのEDTAを含む9 容量の溶解バッファ (pH 8.0) の中に再懸濁させた。室温で5分保存後、12,000 g、15分、4℃で遠心した。その上清液をデカントし、そして横に置き、そしてそのペレットを100  $\mu$  lのH<sub>2</sub>Oに再懸濁させた。その上清液及び再懸濁ペレットから10  $\mu$  lのサンプルを取り、そして10  $\mu$  lの2XのSDSゲル電泳用バッファと混ぜ、そしてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析して、異なるタンパク質のほとんどがペレット中にあるかを調べた。pAN2 のリパーゼ活性がペレット部分の中にほとんどあるかを調べるためにリパーゼスクリーニングアッセイも実施した。

封人体の可溶化及び再生: (Harston ら (1984) より採用)

0.1 MのPHSP (加えたばかり)、8 Mの尿素 (脱イオン化) 及び0.1 Mのベーターメルカプトエタノールを含む100  $\mu$  lの溶解バッファを洗浄したペレットに加え、そして室温で1時間保存した。リパーゼ活性スクリーニングアッセイは、タンパク質が全体的に変性したことに基づいてリパーゼ活性が消失したかどうかを調べるために実施した。50  $\mu$  lづつの変性タンパク質サンプルを透析用チューブに入れた。タンパク質サンプルを50 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH10.7)、1 mMのEDTA (pH8.0)、50 mMのNaCl、並びに8 Mの尿素及び0.1 MのBME も含むバッファの中で透析した。pHはKOH で10.7に保っていた。8 Mの尿素の中で最初の透析は一夜行った。低めの濃度の尿素 (即ち、6 M; 4 M; 2 M; 0 M) を用いる更なる透析はBME 抜きの上記のバッファの中で行った。これらの透析反応体のpHはHCl を用いて8.0に保っていた。更なる濃度の尿素それぞれの中での透析は6時間行った。コントロール実験として、デュブリケートのサンプルを上記の通りに実施したが、ただし尿素とBME は無しで行った。

変性サンプルを透析チューブから取り出し、そしてこれらのサンプルのリパーゼ活性をグリセロールトリブチレート及びブリアントグリーンプレート上で調べた。そのリパーゼ活性も、マイクロタイターリパーゼスクリーニングアッセイを用いて検査した。

SDS - ポリアクリルアミドゲルからのタンパク質の回収

SDS - ポリアクリルアミドゲルからのタンパク質の回収の手順はRager とBurgess (1980) に記載してある。タンパク質サンプルをSDS - ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動させた。電気泳動後、そのゲルをトレイに移し、水ですすぎ、そして氷冷の250 mMのKCl 及び1 mMのDTT で10分酸めた。そのゲルを1 mMのDTT を含む冷水で

脱色し、次いで対象のタンパク質バンドを切り取った。(ゲルの一部はクマジーブルーで染めて、適正なバンドを切り取ったかを確実とするために分子重量標準品を染めた)。そのゲルをG18 の針の付いた1 mlのシリンジを通じて破砕し、そして0.1 %のSDS、50 mMのトリリス/HCl (pH7.9)、0.1 mMのEDTA、5 mMのDTT 及び200 mMのNaCl を含む1 mlの溶解バッファを加えた。タンパク質を、時折攪拌しながら、25°Cで少なくとも1時間溶解させた。その混合物を簡単に遠心して破砕ゲルをペレット化させた。そのタンパク質を上清液から、4 巻量の冷アセトンを加え、次いで-70°Cで20 min インキュベートすることにより沈殿させた。沈殿タンパク質を遠心し、そしてそのペレットを乾した。

ウサギの中で抗-LinA抗血清の作製

LinAに対する抗体を発生させるため、3 羽のウサギに精製LinAタンパク質を、Valtunkaitis (1981) に述べられているのと類似のスケジュールに従って注射した。LinAタンパク質を精製SDS - ポリアクリルアミドゲルから精製した。1 日目において、10 mMのリン酸ナトリウム、pH7.2 中のLin を完全フロイドアジュバントと混ぜ、そして各ウサギの背中に10箇所において皮内注射した。21 日目に、不完全フロイドアジュバントと混ぜたブースター注射を各ウサギの足に筋肉内注射した。同一のブースターを同じようにスケジュールの31 日目に注射した。試験血は抗-LinA 抗体が作製されたことを示した。

増地

LB

リッター当り: 10 g のバクトトリブトン

5 g のバクトー酵母抽出物

10 g のNaCl

プレートは2 %のアガーを食んだ。

実施例

例1

高レベルのLipA発現のための構築

(a) lipA+linA:pAHE2 とpAHE8

プラスミドpAHE2 (図1) を、pSJ150 (Jorgensen ら、1991) 由来のlipA+linAの両者をエンコードする2.264 kbのNdeIフラグメントをNdeI消化pJH2 (Wang ら、1990) にサブクローンすることによって構築した。リゲーション体を大腸菌TG1 に30°Cで形質転換せしめ、次いで適正な配向においてインサートを有するプラスミドを同定するためにDNA ミニ調製品を利用した。pAHE2 は獲得したいくつかの適正な構築体のうちの一つである。pAHE2 において、リパーゼ遺伝子の開始コドンはファージT7リボソーム結合部位のすぐ下流にある。

B57 はpAHE2 で形質転換された大腸菌株JA221 である。B57 を高レベルのタンパク質生産のために誘発せしめたとき、リパーゼタンパク質がSDS ポリアクリルアミドゲル上で同定でき (ウェスタン分析により)、そしてリパーゼ活性がブリアントグリーン及びグリセロールトリブチレートプレート上で、並びにマイクロタイターアッセイ及びpHスタット法により検出できた。

プラスミドpAHE8 (図2) は、pAHE2 由来のlipA+linAをエンコードする2.264 kbのNdeIフラグメントを、NdeIで消化しておいた発現ベクターpET3a にサブクローンすることによって構築した。リゲーション体を大腸菌株TG1 に形質転換せしめ、そしてプラスミドDNA をその形質転換体から調製して適正なプラスミドを同定した。

B73 はpAHE8 で形質転換された大腸菌株BL21 (DE3) pLys S である。B73 を高レベルのタンパク質生産のために誘発せしめたとき、

リパーゼタンパク質 (およそ66kDa) がSDS - ポリアクリルアミドゲル上で認められ、そしてリパーゼ活性がブリアントグリーン及びグリセロールトリブチレートプレート上で、並びにマイクロタイターアッセイで検出できた。

(b) linAを伴わないlipA:pAHE10

プラスミドpAHE10 (図3) は、linA遺伝子のコード領域の2/3 が欠失しているpAHE2 の誘導体である。プラスミドpAHE10は、pAHE2 を制限酵素ClaI及びNotIで消化し、続いてマングベーン (Mung Bean) スクレアゼで処理することによって構築した。サイズ6.3 kbのDNA を、エチジウムブロミドで染めたアガロースゲルからバンドとして切り出した。DNA をGene Cleanキットを用いて精製し、リゲートし、そしてコンビナント大腸菌TG1 に形質転換せしめた。プラスミドDNA ミニ調製品を適正なクローンを選定するために用いた。

B68 はpAHE10で形質転換された大腸菌株JA221 である。B68 を高レベルのタンパク質生産のために誘発せしめたとき、リパーゼタンパク質は、pAHE2 由来のものと同量でSDS - ポリアクリルアミドゲル上及びウェスタン分析により認められたが、リパーゼ活性は検出されなかった。

例2

高レベルのLinA発現のための構築: pCBB6, pCBB7, pCBB12, pCBB18及びpCBB19

linAのみが発現されるプラスミドpCBB6 (図4) を、pSJ150由来の1.17kbのClaI-SphIフラグメントをプラント末端フラグメントとして、NdeIで消化し、次いでプラント末端を作り上げるためにクレノウで処理しておいた発現ベクターpET3a にサブクローンすることによって構築した。大腸菌株B102はpCBB6 で形質転換させた株BL21 (DE3) pLys S である。

プラスミドpCBE7 (図5)は、同じ1.2 kbのClnI-SphIフラグメントを発見ベクターpT7-7にサブクローンすることによって構築した。E103はpCBE7で形質転換されたBL21 (DE3) pLys Sである。E102及びE103の誘発により、約32KDの分子量のタンパク質が観察された。

プラスミドpCBE12 (図6)は、pCBE7のBgl II-BamHIフラグメントをpACYC177にサブクローンすることによって構築した。Liaは、pSJ518 (M090/00908のFig. 3に記載)から発見されたリパーゼに対してトランスにおいてpCBE12から誘発し、そしてpABE10はリパーゼ活性をもたらした。

プラスミドpCBE18及び19 (図7及び8)は、pCBE7のBgl II-BamHIフラグメントをpLys SのBclI部位にサブクローンすることによって構築した。LiaはpABE10由来のリパーゼに対してトランスでpCBE18及び19から誘発し、リパーゼ活性をもたらした。

### 例3

高レベルのタンパク質発現を獲得するための増殖/誘発実験

下記の通りに培養物を誘発せしめて高レベルのLipA及びLiaAの両者を生成せしめた。大腸菌株E57 (JA221/pABE2)及びE68 (JA221/pABE10)を30℃で250 rpmにて一夜増殖させた。その培養物を1:100に希釈し、そしてA600が0.5となるまで30℃、250 rpmで増殖させた。次にその培養物を42℃で増殖するようにした。大腸菌株E102 (BL21 (DE3) pLys S/pCBE6)は37℃で一夜増殖させ、1:100に希釈し、そしてA600が0.5となるまで増殖させた。次いでIPTGをこの培養物に1.5 mMの最終濃度となるまで加えた。15分後、リファンピシンを最終濃度100 µg/mlとなるまで加えた。その培養物を37℃でインキュベートし、且つその増殖中250 rpmで振った。各培養物を誘発の60、90及び120分目において取った。

HagerとBurgess (1980)記載の方法により調製した。サンプルは12%のSDS-PAGEにより分けた。電気泳動後、そのゲルをトランスファーバッファー (10mMのCAPS, 10%のメタノール, pH11)に20min浸した。そのゲルを、100%のメタノール (5~10秒)及び蒸留水 (2×1min)で予備処理しておいたプロット上にエレクトロプロットし、次いでトランスファーバッファーに浸した。エレクトロプロットをトランスファーバッファーの中で室温で3時間、200 mAで実施した。プロットをサンドイッチから取り出し、蒸留水、次いでメタノールの中ですすいだ (5~10秒)。次にそのプロットを1% (v/v)の酢酸、40% (v/v)のメタノール中のアミドブラック (0.1% w/v)の中で1min染色した。そのプロットを蒸留水を順次に交換しながらすすぎ、風乾し、次いで濾紙の層の間で20℃で保管した。LiaA及びアレリパーゼに相当するバンドを切り出し、そしてApplied Biosystems 477Aタンパク質シーケンサーで正確配列決定した。

下記の配列が得られた。

LiaA (pCBE6): TARGGRAPL-HRAVVVGAVG (SEQ ID NO 6)

preLipA (pABE2): ARTHRSRVVAGAVA-ANSTIA (SEQ ID NO 7)

preLipA (pABE10): ARTHRSRVVAGAV-AM-IA (SEQ ID NO 8)

N-末端メチオニンが削除されていることを除き、その配列はDNA配列から推定したLiaA及びpreLipAについての予測通りの配列であった。

方法の欄に記載の通りに、ポリクローナル抗体を発生するためにゲル精製LiaAタンパク質を使用した。

タンパク質の純度を更なるSDS-PAGE分析によりチェックした。

サンプルを、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及びリパーゼに対して発生せしめた抗血清を用いるウェスタン分析により分析した。図9及び10を参照のこと。リパーゼタンパク質はpABE2又はpABE10のいずれかを含む株において同量で誘発されることが観察された。大多数の約95%のリパーゼが、シェードモナス・セバシアより単離された成熟リパーゼより大きく、そしてそのサイズは完全アレリパーゼについて予測されるそれと一致した。マイクロタイターアッセイによってリパーゼ活性についてもサンプルをアッセイした。リパーゼ活性はE57の培養物 (pABE2, lipA+liaA)から観察されたが、E68 (pABE10, lipAのみ)又はE102 (pCBE6, liaA)の培養物からは観察されなかった。

結果が示すには、リパーゼタンパク質はliaA遺伝子の存在下及び非存在下において同量で作られるが、しかしliaAの非存在下ではリパーゼ活性は検出されなかった。活性リパーゼはliaA遺伝子も存在しているときにのみ生産された。

### 例4

LipA及びLiaの精製

JA221/pABE2; JA221/pABE10; BL21/pLys S/pCBE6及びBL21の一夜培養物を100 mlのLB培地に1:100に希釈し、そして0.5のOD600値に増殖させた。pABE2及びpABE10の場合における熱による誘発、並びにpCBE6の場合におけるIPTGによる誘発を2時間実施した。次にその培養物を500 µl、15分、4℃で遠心した。

細胞を記載の方法により溶解せしめた。Liaタンパク質は細胞リゼートの可溶性画分の中に見い出された。リパーゼは封入体において隠れていることが見い出された。封入体はHarstonら (1984)より採用した方法により用意した。純粋なリパーゼ及びLiaタンパク質を、封入体及び可溶性リゼート画分それぞれのSDS-PAGEを経て、

### 例5

pABE2及びpABE10 LipAの変性及び再生

変性/再生実験を、pABE2又はpABE10のいずれかに由来のLipA (封入体の中に存在)と、LiaA (pCBE6、そして細胞リゼートの中に存在)とにより実施した。60 µlの封入体を様々な量のpCBE6細胞リゼート (0~30 µl)と混ぜ、そして8 Mの尿素の中で一晩に可溶性させた。再生は、濃度の低まっていく尿素に対する透析により実施した。実験は5%のグリセロールの存在下及び非存在下で実施した。リパーゼ活性をpHスタットを利用して測定した。

実験結果は (下記に示す)、リパーゼ活性の%の上昇は、増加していくLiaAの量の存在下での変性/再生により回復すること、及びグリセロールの存在はリパーゼ活性の回復に影響しないことを示唆した。

pABE2及びpABE10 LipAについての結果

封入体未希釈: リゼート由来のLiaA

pABE2 (pJW2 :: lipA/liaA) について = 7.5 LU (容量60 µl)  
測定された初期リゼート活性

pABE10 (pJW2 :: lipA) について = 0 LU  
測定された初期リパーゼ活性

## 変性及び再生

サンプル	変性した LUの値	回復した LUの値 (-ゲル電泳)	回復した LUの値 (+ゲル電泳)
pABE2 + 0 $\mu$ l LlmA	7.5	5.3	5.3
pABE2 + 10 $\mu$ l LlmA	7.5	9.3	8.3
pABE2 + 20 $\mu$ l LlmA	7.5	12.3	9.0
pABE2 + 30 $\mu$ l LlmA	7.5	13.2	13.5
pABE2 + 無-LlmA			
リゼート, 30 $\mu$ l	7.5	5.0	nd.
pABE10 + 0 $\mu$ l LlmA	0.0	0.0	0.0
pABE10 + 10 $\mu$ l LlmA	0.0	5.5	10.5
pABE10 + 20 $\mu$ l LlmA	0.0	8.3	8.5
pABE10 + 30 $\mu$ l LlmA	0.0	16.0	11.0
pABE10 + 無-LlmA			
リゼート, 30 $\mu$ l	0.0	0.0	nd.

## 例 6

pABE2 及び pABE10 LipA の変性及び再生

この一式の実験のために、封入体面分を 1 : 10 に希釈した。pABE2 及び pABE10 (lip) 封入体並びに pCBE6 (Llm) 細胞リゼートのサンプルを SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。変性／再生実験において用いたタンパク質の量を測定するために Biorad タンパク質アッセイを利用した。10  $\mu$  l の pABE2 封入体は 10  $\mu$  g のタンパク質を含むことが決定された；10  $\mu$  l の pABE10 封入体は 8  $\mu$  g のタンパク質を含んでいた；そして 10  $\mu$  l の pCBE6 リゼートは 25  $\mu$  g の総タンパク質を含んでいた。

た。

イムノブロット (図 11) 及びリパーゼ活性分析は、細胞外面分は活性な成熟リパーゼのみを含み、一方、細胞内面分は不活性なプレリパーゼのみを含むことを示した。

面分	リパーゼ活性	タンパク質 %	プレリパーゼ	リパーゼ
細胞内	-	100	nd	
細胞外	+	nd		100

LlmA が大腸菌 BL21 (DE3) pLys S pCBE6 の抽出物として供されたとき、P. セバシア 由来の成熟細胞外リパーゼは LlmA の存在下においてのみ、変性／再生後に定量的に再活性化されることができた。同一の実験において、LlmA を伴って又は伴わないで細胞内プレリパーゼを利用したときは、下記の変から明らかな通りリパーゼ活性は認められなかった。

P. セバシアの細胞面分	変性前の LU	再生後の LU
細胞内面分 (プレリパーゼ)		
20 $\mu$ l + 0 $\mu$ l LlmA	0.0	0.0
20 $\mu$ l + 10 $\mu$ l LlmA	0.0	0.0
20 $\mu$ l + 20 $\mu$ l LlmA	0.0	0.0
20 $\mu$ l + 30 $\mu$ l LlmA	0.0	0.0
20 $\mu$ l + 30 $\mu$ l 無-LlmA リゼート	0.0	0.0
細胞外面分 (成熟リパーゼ)		
20 $\mu$ l + 0 $\mu$ l LlmA	1.5	0.0
20 $\mu$ l + 10 $\mu$ l LlmA	1.5	0.4
20 $\mu$ l + 20 $\mu$ l LlmA	1.5	0.8
20 $\mu$ l + 30 $\mu$ l LlmA	1.5	1.3
20 $\mu$ l + 30 $\mu$ l 無-LlmA リゼート	1.5	0.0

この実験の結果は (下記に示す)、変性／再生反応における LlmA の量の上昇は、リパーゼ活性の回復率の初期上昇をもたらすことを示唆する。更なる量の LlmA の反応への付加は阻害的である。

## pABE2 及び pABE10 リパーゼについての結果

封入体は 1 : 10 に希釈；リゼート由来の LlmA

透析サンプル 回復したリパーゼユニットの値

pABE2 10 $\mu$ l	0.4
pABE2 " + 10 $\mu$ l LlmA	5.6
pABE2 " + 15 $\mu$ l LlmA	5.7
pABE2 " + 20 $\mu$ l LlmA	4.5
pABE2 " + 30 $\mu$ l LlmA	9.5
pABE2 " + 40 $\mu$ l LlmA	3.2

pABE10 10 $\mu$ l	0.0
pABE10 " + 10 $\mu$ l LlmA	2.5
pABE10 " + 15 $\mu$ l LlmA	7.8
pABE10 " + 20 $\mu$ l LlmA	7.3
pABE10 " + 30 $\mu$ l LlmA	3.8
pABE10 " + 40 $\mu$ l LlmA	0.5

## 例 7

シェードモナス セバシア DSH 3959 由来のリパーゼ及びプレリパーゼ

P. セバシア DSH 3959 (それより lipA 及び llaA をクローンした株) を誘発して、80 g/l のオレイルアルコールを添加した LB 培地の中で増殖によりリパーゼを生産させ、次いで細胞外、ペリプラズマ及び細胞内面分を New と Kappel (1985) に記載の通りに分離し

再生実験中での LlmA による、P. セバシア 由来のプレリパーゼではなくリパーゼの活性化は、大腸菌の中で生産されたリパーゼタンパク質を利用しての結果と一致した。大腸菌リパーゼサンプルは約 5 % の成熟タンパク質及び 95 % のプレリパーゼより成る。変性前 (pABE2 のみ) 及び再生後 (pABE2 及び pABE10) に観察されたリパーゼ活性の値は、SDS - PAGE で認められたリパーゼタンパク質の総量より予測される値のほぼ 5 % に相当した。

## 例 8

成熟 LipA タンパク質の発現のための構築

シグナルペプチドを欠く形質、即ち成熟リパーゼとしてリパーゼ LipA が発現されるプラスミドを構築した。これらは成熟リパーゼをエンコードする lipA 遺伝子の改変バージョン、それに続く llaA 遺伝子を含む pABE19 (図 12)、及び llaA 抜き成熟リパーゼをエンコードする pABE22 (図 13) である。それらは下記の通りに構築した：

下記の DNA フラグメントを合成した (標準方法)：

(HindIII) (HindIII)  
 5' - CGCGTAAGCTTCACATTGAAGGGGAGGAGCAATCATGGCC -  
 3' - ATTGGAAGTGTAACTTCCCTCCTTGTAGTACCGG -  
 (HindIII)

GCTGCTACGGCGGA - 3' (SEQ ID NO 9)

CGACCGATGCGCGCTGCGC - 5' (SEQ ID NO 10)

この DNA フラグメントは基本的には、パチルス リシニホルミ ス myl リソソーム結合部位及び開始コドン、成熟 LipA タンパク質の N 末端由来のアミノ酸 AAGYAA (SEQ ID NO 11) をエンコードする配列の前に含む。

この DNA フラグメントを、HindIII 消化 pSJ420 (N090/00908 に記載の pSJ416 と同一) にリゲートし、そして pSJ838 をプラスミドとして単

融した。その中の合成DNA フラグメントにおけるHind III部位はpSJ420上の $\alpha$ mylプロモーターに近位する。

pSJ838は $\alpha$ mylプロモーター、 $\alpha$ myl RBS、lipAの最初の6コドンに融合した $\alpha$ mylシグナルペプチド、 $\alpha$ myl RBS、成熟lipA及びlimAを保有する。

pSJ838からの組換えにより(Jorgensen ら、1990に本質的に記載の通り)プラスミドpSJ897を獲得し、これは $\alpha$ mylプロモーター、 $\alpha$ myl RBS及び成熟lipA、それに続くlimAを含む。pSJ897上の $\alpha$ myl RBSからのすぐ上流に制限酵素NdeIに関する塩基配列がある。

pABE19を、pJM2の4.9 kbのNdeI-EcoRI フラグメント、pSJ897の0.46 kbのNdeI-BamHI フラグメント及びpSJ150の2.07 kbのBamHI-EcoRI フラグメントのリゲーションにより構築した。

pABE22をpABE19から、ClaI+NotI消化及びリゲーション、それに続く末端をプラント化するためのエクソスクレアゼS1処理により構築した。

誘発に際し、pABE22を含む大腸菌JA221 からではなく、pABE19を含む大腸菌JA221 からリパーゼ活性が認められた。

#### 例9

limAを伴う及び伴わないでの成熟lipAの産性及び再生

成熟リパーゼを、方法において記載した細胞の誘発、回収及び溶解を経た可溶性画分として用意し、そして方法において記載した通り、limA含有細胞リゼートの存在下及び非存在下での産性/再生実験において利用した。

この実験の結果(下記の変)、limAの存在下で大腸菌で生成された成熟lipAのみが、活性リパーゼ酵素をもたらしめるように再生されうることを示した。

ンから3塩基対下流に位置する。

lipDをエンコードするDNA 配列をSEQ ID NO 1 に、そしてSEQ ID NO 3に対応のタンパク質配列を示す。limDをエンコードするDNA 配列をSEQ ID NO 2 に、そしてSEQ ID NO 4 に対応のタンパク質配列を示す。

lipAとlipDのアミノ酸配列の整合研究より、lipDアミノ酸配列が推定できない5つの箇所に加えて、酵素の成熟部において22箇所の相違があった。

limAとlimDのアミノ酸配列の整合研究により、limDのアミノ酸配列が推定できない2つの箇所に加えて、32箇所の相違があった。

これらの研究に基づき、lipDとlipA、及びlimDとlimAは相関性ではあるが、しかしながら異なるリパーゼ及びリパーゼ調節因子タンパク質であることが明らかとなった。

従って、limAが産性/再生実験においてlipDを活性化できるかが課題となった。

#### 例11

P. セバシアから精製したlipDによる産性/再生実験

株7510-A (=DSM 3401) 由来のlipDを、標準のタンパク質精製法を利用して、DSM 3401からの部分精製タンパク質として用意した。

limAの存在下及び非存在下で、株7510-Aの由来のリパーゼを用いて産性/再生実験を行った。18LUを、様々な比のlimAにより産性及び再生し、そして回復リパーゼ活性を測定した。リパーゼ活性はpH スタットで測定した。コントロールとして、酵素の非存在下でも実験を行った。

結果が示すには、7510-AリパーゼをlimAの非存在下で産性及び再生すると、リパーゼ活性は有効に回復しなかった。高めたレベルのlimAを7510-Aリパーゼに加えると、高められたレベルのリパーゼ活

pABE19: 成熟lipA, limA,

pABE22: 成熟lipA.

	産性前のLU	産性後のLU
pABE19(100 $\mu$ l)	0.5	0.5
pABE19(100 $\mu$ l) + limA (10 $\mu$ l)	0.5	0.5
pABE19(100 $\mu$ l) + limA (20 $\mu$ l)	0.5	0.75
pABE19(100 $\mu$ l) + limA (30 $\mu$ l)	0.5	0.75
pABE19(100 $\mu$ l) + 無-LimA リゼート (30 $\mu$ l)	0.5	0.25
pABE22(100 $\mu$ l)	0.0	0.0
pABE22(100 $\mu$ l) + limA (10 $\mu$ l)	0.0	0.5
pABE22(100 $\mu$ l) + limA (20 $\mu$ l)	0.0	0.75
pABE22(100 $\mu$ l) + limA (30 $\mu$ l)	0.0	0.75
pABE22(100 $\mu$ l) + 無-LimA リゼート (30 $\mu$ l)	0.0	0.0

#### 例10

P. セバシアDSM 3401からのlipD及びlimDのクローニング及び配列  
株75-10A と呼んでいるP. セバシア、DSM 3401の別の単離体は、DSM 3959由来のlipAに類似なリパーゼを生成する。

DSM 3401由来のリパーゼエンコードDNA のクローニング及び配列決定 (M090/00908に記載の標準方法を採用) は、lipA及びlimAに対して比較的高い相関性を有する以降lipD及びlimDと呼ぶ二本の遺伝子を示した。

極端なるDNA のGC含有に基づき、その配列は決定することが困難であり、従っていまだに部分的に未決定な配列が残っている-lipD遺伝子における4位、及びlimD遺伝子における2箇所の位置。

limD開始コドンは、lipA及びlimAの場合のように、lipD停止コド

性が認められた。しかしながら、回復したリパーゼ活性の%は非常に低いままであった。

#### 7510-Aリパーゼについての結果

13,000LU/mlのストックを使用; リゼート由来のlimA

サンプルは選析	LUの値 産性	回復した LUの値 (+UTEA)	%回復率
7510A 15 $\mu$ l	18	0.25	1.4
7510A " + 5 $\mu$ l limA	18	0.25	1.4
7510A " + 10 $\mu$ l limA	18	0.4	2.2
7510A " + 15 $\mu$ l limA	18	0.35	2.0
7510A " + 30 $\mu$ l limA	18	0.45	2.5

リパーゼ活性の低い回復率についての説明は後にする。特定の調製品中のリパーゼは、産性/再生の際に劣化することが認められ、従って実験を、DSM 3401由来のリパーゼ及び誘発したBL21 (DE3) plys pC886由来のlimAの新たな部分精製調製品で繰り返した。以下の結果は、limAがlipDをよく活性化できることを示す。

	産性前LU	再生後LU	%回復率
lipD (10 $\mu$ l) +	80	0.1	0.08
lipD (10 $\mu$ l) + 5 $\mu$ l limA	80	44	35
lipD (10 $\mu$ l) + 10 $\mu$ l limA	80	45	36
lipD (10 $\mu$ l) + 20 $\mu$ l limA	80	56	45
lipD (10 $\mu$ l) + 30 $\mu$ l limA	80	55	44
lipD (10 $\mu$ l) + 40 $\mu$ l limA	80	53	42

#### 例12

lipDの発現のための構築

lipA配列は成熟lipA配列における7個のアミノ酸に対応する位置

においてHinfI部位を、そしてIipA停止コドンの後にClaI部位を含む。  
IipD配列は同じ位置にHinfI及びClaI部位を含む。

従って、プラスミドは前者のIipA発現ベクターに基づき、ハイブリッドタンパク質の発現を可能とするために、IipA HinfI-ClaIフラグメントの代りに、成熟タンパク質における最初の7個のアミノ酸のみがIipAに由来しており、一方、成熟タンパク質の残りがIipDに由来しているIipD HinfI-ClaIフラグメントの挿入により簡単に構築できる。

pAHE16 (図14) はIipA-IipDハイブリッドリパーゼをLimAと共に発現し、そして前述の通りのHinfI-ClaIフラグメントの交換によりpAHE2 から構築されたものである。pAHE23 (図15) はIipA-IipDハイブリッドリパーゼのみを発現し、そしてLim タンパク質は発現しない。これはpAHE16より、LimAのClaI-NotIフラグメントの欠失により構築されたものである。

#### 例13

IipA-IipDハイブリッドリパーゼの産性/再生

pAHE16及びpAHE23から発現させたIipA-IipDハイブリッドタンパク質を、方法において記載の通りにLimAを加えた及び加えていない産性/再生実験に用いた。

この実験に用いたリパーゼサンプルは、pAHE16又はpAHE23のいずれかを含む肺炎大腸菌JA221 細胞の培養を経た可溶性画分である (肺炎に基づいて大多数のリパーゼタンパク質は封入体に残っていたが、可溶性画分は若干のリパーゼをまだ含んでおり、そして封入体よりも可溶性画分の中に比較的多くの成熟リパーゼがあるようであった)。

LimAはBL21 (DE3) pLys S pC886 の肺炎培養物より得た。

下記に示す結果は、LimAが産性/再生実験においてIipA-IipDハ

イブリッドリパーゼを活性化できることを示す。

	産性前のLU	再生後のLU
pAHE16 (30 $\mu$ l) +	0.5	0.5
pAHE16 (30 $\mu$ l) + LimA (10 $\mu$ l)	0.5	0.75
pAHE16 (30 $\mu$ l) + LimA (20 $\mu$ l)	0.5	0.75
pAHE16 (30 $\mu$ l) + LimA (30 $\mu$ l)	0.5	0.75
pAHE16 (30 $\mu$ l) + LimA (40 $\mu$ l)	0.5	1.0
pAHE16 (30 $\mu$ l) + 無-LimA 細胞リゼート (40 $\mu$ l)	0.5	0.5
pAHE23 (30 $\mu$ l) +	0.0	0.0
pAHE23 (30 $\mu$ l) + LimA (10 $\mu$ l)	0.0	0.75
pAHE23 (30 $\mu$ l) + LimA (20 $\mu$ l)	0.0	0.75
pAHE23 (30 $\mu$ l) + LimA (30 $\mu$ l)	0.0	1.0
pAHE23 (30 $\mu$ l) + LimA (40 $\mu$ l)	0.0	1.0
pAHE23 (30 $\mu$ l) + 無-LimA 細胞リゼート (40 $\mu$ l)	0.0	0.0

#### 例14

Iip-Lim 融合体の構築

プラスミド pSJ721 は pSJ377 の欠失構築体であり、その15bpはClaI 部位において欠失しており、IipAの停止コドン及びlim の最初の3個のアミノ酸についてのコドン (Jorgensen ら, 1991) を欠いている。従って、pSJ721は、IipAのC末端においてのSphI部位に続く8個のアミノ酸に融合されたLim タンパク質をエンコードする。pSJ721の838 bpのSphI-NotIフラグメント (これはlim の大部分に融合したIip のC末端を含む) 及びpSJ150の915 bpのHinfI-SphIフラグメント (これはリゼートコード配列の大部分を含む) を、HinfI及びNotIで消化しておいたpAHE8 にリゲートし、Iip-Lim 融合プラ

スミドを作った。lim遺伝子の始まりにおいて通常存在しており、且つpSJ721になく、そしてIip-Lim 融合プラスミドにおいてないべきであるClaI部位の欠失について形質転換体をスクリーンした。制限酵素分析からいくつかのプラスミドが適正であることが認められた。そのうちの6個をpC881-6 と命名した (図16)。

大腸菌BL21 (DE3) pLys S を各融合プラスミドにより形質転換させ、次いでその形質転換体を増殖させ、そしてIPTGで誘発した。トリブチリンプレートでのプレート及び培養サンプルにおける活性の分析は、これらのプラスミドが誘発に基づきリパーゼ活性を示すことを示した。細胞及び培養の両者に由来するタンパク質サンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル及び抗リパーゼ抗血清を用いるウェスタン分析により分析した。サイズにおいてpAHE2 又はpAHE8 により生成されたプロセスを受けていないリパーゼと同一であるリパーゼタンパク質のみが検出された。誘発実験のタイムコースの初期に採取したサンプルにおいても、期待の高分子量のタンパク質は認められなかった。おそらく、人工Iip-Lim 融合体はタンパク質の連結部でタンパク質分解を特に受け易いであろう。

#### 文 献

- Clarke, L. and Carbon, J. (1978) *J. Mol. Biol.* 120, 517-534.
- Ellis, R. J. & van der Vliet, S. M. (1991). *Annual Review of Biochemistry* 60, 321-347.
- Hager, D. A. and Burgess, R. R. (1980) Elution of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulphate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escheria coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase and other enzymes. *Anal. Biochem.* 109, 76-86.
- Jorgensen, S., Skov, K. W. and Diderichsen, B. (1991) Cloning, sequence and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. *J. Bacteriol.* 173, 559-567.
- Harston, P. A. O. (1987) The purification of eukaryotic polypeptides expressed in *E. coli*. In *DNA Cloning: A practical approach* (ed D. M. Glover), vol. 3, p. 59. IRL Press, Oxford.
- Harston, P. A. O., P. A. Lowe, M. T. Doel, J. M. Schoemaker. 1984. Purification of calf prochymosin synthesized in *E. coli*. *BioTechnology* 2: 800.
- Rosenberg, A. M., Chui, D. S., Liu, S.-W., Dunn, J. J., and Studier, P. W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. *Gene* 56 125-135.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd edition
- Vaitukaitis, (1981) *Methods in Enzymology* 21, 46-52

- Wang, H., McConnell, D. J. and O. Mahony, D. J. (1990) Anefficient temperature-inducible vector incorporating the T7 gene 10 translation initiation leader region. *Nucleic Acids Res.* 18, 1070.
- New, R. C., Heppel, L. A. (1965), *J. Biol. Chem.* 240, 3685-3692.
- Jorgensen, P. L., Hansen, C. K., Poulsen, G. B., Diderichsen, B. (1990), *Gene*, 96, 37-41.
- S. Aoyama ら, *FEBS Letters* 242 (1), December 1988, pp. 36-40
- W. Kuslitsya ら, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 141 (1), November 26, 1986, pp. 185-190
- R. J. Ellis and S. M. Hemmingsen, *Trends Biochem. Sci.* 14, 1989, pp. 339-342 ;
- J. E. Rothman, *Cell* 59, 1989, pp. 591-601
- R. Morimoto ら in *Stress Proteins in Biology and Medicine*, R. Morimoto ら, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1990, pp. 1-36)
- Sambrook ら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1989
- S. L. Beaucage and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, 1981, pp. 1859-1869,
- Matthes ら, *EMBO Journal* 3, 1984, pp. 801-805

以下の配列表において

- SEQ ID NO 1 はlipDのヌクレオチド配列であり；
- SEQ ID NO 2 はlipDのヌクレオチド配列であり；
- SEQ ID NO 3 はlipDのアミノ酸配列である。その配列はプレリパーゼのそれであり、成熟リパーゼの第1アミノ酸残基はAである（アミノ酸残基45）。
- SEQ ID NO 4 はlipDのアミノ酸配列であり；
- SEQ ID NO 5 はlip-lip 融合遺伝子のヌクレオチド配列であり；
- SEQ ID NO 8-8 は例4に説明したペプチドフラグメントであり；
- そして
- SEQ ID NO 9-11は例8に示すヌクレオチド及びアミノ酸配列である。

# 配 列 表

## (1) 一般情報：ノボ ノルディスク A/S

### (i) 出願人：

- (A) 名称：ノボ ノルディスク A/S
- (B) 通り：ノボ アレ
- (C) 市：バグスバード
- (E) 国：デンマーク
- (F) 郵便番号：DK-2880
- (G) 電話：+45 4448888
- (H) テレファックス：+45 4449 3256
- (I) テレックス：37304

### (ii) 発明の名称：活性リパーゼの製造のための方法

### (iii) 配列の数：11

### (iv) コンピューター読み取り方式：

- (A) 媒体のタイプ：フロッピーディスク
- (B) コンピューター：IBM PC コンパチブル
- (C) 作動システム：PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア：パテントイン リリース#1.0、バージョン#1.25 (BPO)

### (vi) 先の出願のデータ：

- (A) 出願番号：WO PCT/DK91/00402
- (B) 出願日：1991年12月20日

## (2) SEQ ID NO:1 についての情報：

### (i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：1092 塩基対
- (B) 種類：核酸
- (C) 数の数：一本鎖

### (D) トポロジー：直鎖

### (H) 分子の型：DNA (ゲノム)

### (III) ハイボセチカル：NO

### (II) アンチセンス：NO

### (V) フラグメントの型：内部

### (vi) 起源：

- (A) 生物：シュードモナス セバシア
- (B) 株：DSM 3401

### (xi) 配列の詳細：SEQ ID NO: 1:

```

ATGCCAGAT CGATCGCTTC CAGGGTGGTG GCAGGGGCAG TGGCATGCC 50
GATGAGCGTC GCGCCGTTTC CCGGGGCGAC CCGGTGATG ACGCTTCCGA 100
CGAGCGACGC GCGGATGCG GCGACCGCGC CCGCCGACGA CTACCGGACG 150
ACCGTTATC CGATCATCTT CGTGCACGGG CTCACGGGTA CCGACAAGTA 200
CGCGGGCGTG CTCGAGTACT GGTACGGCAT CCAGGAAGAC CTCGAGCAGC 250
ATGGCGCGAC CGTCTACGTC GCGAACCTGT CCGGCTTCCA GAGCGACGAC 300
GGGCGGAACG GCGCGGCGCA ACAGTTCCTC GCGTACGTGA AGACGCTGCT 350
CGCGCGGACG GCGCGGACCA AGGTCAATCT CGTGCGCCAC NCGCAGGGCG 400
GGCTCAGCTC GCGTTACGTT GCGGCTGTGC CCGCCGATCT CGTGCGCTCG 450
GTGACGACGA TCGGCACGCC GCATCTGTGN NCGGAGTTTC CCGACTTCGT 500
GCAGGGCGTG CTCGCATACG ATCCGACCGG GCTTTCGTCA TCGGTGATCG 550
CGGCGTTCTT CAATGTGTTT GGAATCTCTA CGAGCAGCAG CCACAACACG 600
AACCGGACG CACTCGCGTC GCTGAAGACG CTGACGACCG CCCAGGCCCG 650
CGCGTACACG CAGAACTATC CGAGCGCGGG CTTGCGTGGG CCGGGCAGTT 700
GCCAGACCGG CNWCCGACG SAACCGTGG GGTNCAACAC GCATCTGCTG 750
TATTCGTGGG CCGGCACGGC GATCCAGCGC ACGCTCTCCG TGTTCGGTGT 800
CAGCGGCGCG ACGGACACGA GCACCATTCG GCTCTGCTAT CCGGCGAAGC 850
CGCTCGACCC GTCGACGCTT CCGCTGTTTC GCACGGGCAC GGTGATGATC 900

```



特表平7-504561 (15)

AACCGCGGCT CGGCGCCGAA CGACGGGCTC GTATCGAAGT GCAGCGGCGT 950  
GTACGGCCAG GTGCTGACCA CGAGCTACAA GTGGAACCAT ATCGACGAGA 1000  
TCAACCAATT GCTCGGCGTG CGCGCGCGCA ATCGCGAAGA TCCGCTCGCG 1050  
GTGATCGGCA CGCATCGGAA CGGCTGAAG CTGCGCGGCG TG 1092

(2) SEQ ID NO:2 についての情報:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1032塩基対

(B) 種類: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(H) 分子の型: DNA (ゲノム)

(M) ハイボセティカル: NO

(N) アンチセンス: NO

(V) フラグメントの型: 内部

(vi) 起源:

(A) 生物: シュードモナス セバシア

(B) 株: DSM 3401

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 2:

ATGGCGGCAC GTGAAGGGCG CGCGCGGCTG GCGCGGCGCG CTGAGTCTA 50  
CGGTGTGCTG GGGCTGGCGG CGATCGCGCG CGTCCGCGTG TGGAGCGGGG 100  
CGGGATGGCA TCGCGGTACG GGTAGCGTGG CGGAAGCGCG CGATGCGGCG 150  
GCACTGGGCG CGGTGGCTGC GGCACCGCGG CAGGCGGCGG TCGCGGCGAG 200  
CGCGGGCGTG CGGTGCTGCG TGGCGGCGTG CAGCGCGCGG CGGTGCGCG 250  
TGGATGCGCG CGGCGATCTC GCGAAGGTGC GCGCGGTGCG CGATTTCCTC 300  
GACTACTGCG TGACCGCGCA GAGCGACCTC AGTGGCGGCG CGCTCGATCG 350  
ACTGCTGCTG CGCGAGATTG CGCGCGAGCT CGACGGCAGG CGGCGCGCAG 400  
CGGAGCGGCT CGACGTGTGG CATCGGTATC GTGCGTATCT CGACGGCGTG 450

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 3:

Met Ala Arg Ser Met Arg Ser Arg Val Val Ala Gly Ala Val Ala 1  
1 5 10 15  
Cys Ala Met Ser Val Ala Pro Phe Ala Gly Ala Thr Ala Val Met 20  
20 25 30  
Thr Leu Ala Thr Thr His Ala Ala Met Ala Ala Thr Ala Pro Ala 35  
35 40 45  
Asp Asp Tyr Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Ile Ile Leu Val His Gly 50  
50 55 60  
Leu Thr Gly Thr Asp Lys Tyr Ala Gly Val Leu Glu Tyr Trp Tyr 65  
65 70 75  
Gly Ile Glu Glu Asp Leu Glu Glu His Gly Ala Thr Val Tyr Val 80  
80 85 90  
Ala Asn Leu Ser Gly Phe Glu Ser Asp Asp Gly Pro Asn Gly Arg 95  
95 100 105  
Gly Glu Glu Leu Leu Ala Tyr Val Lys Thr Val Leu Ala Ala Thr 110  
110 115 120  
Gly Ala Thr Lys Val Asn Leu Val Gly His Xaa Glu Gly Gy Leu 125  
125 130 135  
Thr Ser Arg Tyr Val Ala Ala Val Ala Pro Asp Leu Val Ala Ser 140  
140 145 150  
Val Thr Thr Ile Gly Thr Pro His Arg Xaa Xaa Glu Phe Ala Asp 155  
155 160 165  
Phe Val Glu Gly Val Leu Ala Tyr Asp Pro Thr Gly Leu Ser Ser 170  
170 175 180  
Ser Val Ile Ala Ala Phe Val Asn Val Phe Gly Ile Leu Thr Ser 185  
185 190 195  
Ser Ser His Asn Thr Asn Glu Asp Ala Leu Ala Ser Leu Lys Thr 200  
200 205 210  
Leu Thr Thr Ala Glu Ala Ala Ala Tyr Asn Glu Asn Tyr Pro Ser 215  
215 220 225  
Ala Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ser Cys Glu Thr Gly Xaa Pro Thr 230  
230 235 240  
Glu Thr Val Arg Xaa Asn Thr His Leu Leu Tyr Ser Trp Ala Gly 245  
245 250 255

GCGAACTGC GCGATGCCG CGCGGTGCG AGTCCGACC TGGCGCGCT 500  
CGAGCTCGCG CTCGACCAGC GCGCATCGAT CGGTATCGC ACCTCGCGG 550  
ACTGGAGCCA GCGGTCTTC GCGCGCGAGC AGTGGCGGCA GCGCTACCAT 600  
CTCGCGCGCG TGAAGATCGC GCAGGATCGC ACCTGACCG ATGCGGAGAA 650  
GGCGGAACGG CTCGCGGCGC TGCAGCAACA GATCGCGGCG GACGAACGCG 700  
CGGCTCAGCA GCGGTGCGAC GCGCAGCGCG CGCGCATCGA CGAGAGTCCG 750  
NAGTTGCGA AGAGCGGGAC GACGCGCGAT CGCATGCGCG CGCAACTGAC 800  
GCAGACGCTC GGGCGCGHAG CGCGCGCGCG CGTCGCGCAG ATGCGGCGG 850  
ACGACGCTC GTGGCAGAGN CGCTACGCGG ACTATCGCGG GCAGCGCGCG 900  
CAGATCGAGT CGCGCGGCGT GTGCGCGCAG GCGCGCGGCG CGCAGATCGC 950  
CGCACTCGCG CAGCGCGTGT TCAGGAAGCC CGCGGAAGCC GTGCGCGCGG 1000  
CGTCACTCGA TCGCGCGGCG GCGCAGCGCG AG 1032

(2) SEQ ID NO:3 についての情報:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 364 アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(H) 分子の型: タンパク質

(M) ハイボセティカル: NO

(N) アンチセンス: NO

(V) フラグメントの型: 内部

(vi) 起源:

(A) 生物: シュードモナス セバシア

(B) 株: DSM 3401

Thr Ala Ile Glu Pro Thr Leu Ser Val Phe Gly Val Thr Gly Ala 260  
260 265 270  
Thr Asp Thr Ser Thr Ile Pro Leu Val Asp Pro Ala Asn Ala Leu 275  
275 280 285  
Asp Pro Ser Thr Leu Ala Leu Phe Gly Thr Gly Thr Val Met Ile 290  
290 295 300  
Asn Arg Gly Ser Gly Pro Asn Asp Gly Leu Val Ser Lys Cys Ser 305  
305 310 315  
Ala Leu Tyr Gly Glu Val Leu Ser Thr Ser Tyr Lys Trp Asn His 320  
320 325 330  
Ile Asp Glu Ile Asn Glu Leu Leu Gly Val Arg Gly Ala Asn Ala 335  
335 340 345  
Glu Asp Pro Val Ala Val Ile Arg Thr His Ala Asn Arg Leu Lys 350  
350 355 360  
Leu Ala Gly Val

(2) SEQ ID NO:4 についての情報:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 344 アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(H) 分子の型: タンパク質

(M) ハイボセティカル: NO

(N) アンチセンス: NO

(V) フラグメントの型: 内部

(vi) 起源:

(A) 生物: シュードモナス セバシア

(B) 株: DSM 3401

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Ala Arg Glu Gly Arg Ala Pro Leu Ala Arg Arg Ala Ala 1  
1 5 10 15

特表平7-504561 (16)

Val Tyr Gly Val Val Gly Leu Ala Ala Ile Ala Gly Val Ala Met  
20 25 30  
Trp Ser Gly Ala Gly Trp His Arg Gly Thr Gly Ser Val Gly Glu  
35 40 45  
Ala Pro Asp Ala Ala Ala Val Gly Gly Val Ala Ala Ala Pro Pro  
50 55 60  
Gln Ala Ala Val Pro Ala Ser Ala Gly Leu Pro Ser Ser Leu Ala  
65 70 75  
Gly Ser Ser Ala Pro Arg Val Pro Leu Asp Ala Gly Gly His Leu  
80 85 90  
Ala Lys Val Arg Ala Val Arg Asp Phe Phe Asp Tyr Cys Leu Thr  
95 100 105  
Ala Gln Ser Asp Leu Ser Ala Ala Ala Leu Asp Ala Leu Val Val  
110 115 120  
Arg Gln Ile Ala Ala Gln Leu Asp Gly Thr Ala Ala Gln Ala Glu  
125 130 135  
Ala Leu Asp Val Trp His Arg Tyr Arg Ala Tyr Leu Asp Ala Leu  
140 145 150  
Ala Lys Leu Arg Asp Ala Gly Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Gly  
155 160 165  
Ala Leu Gln Leu Ala Leu Asp Gln Arg Ala Ser Ile Ala Tyr Arg  
170 175 180  
Thr Leu Gly Asp Trp Ser Gln Pro Phe Phe Gly Ala Glu Gln Trp  
185 190 195  
Arg Gln Arg Tyr Asp Leu Ala Arg Leu Lys Ile Ala Gln Asp Arg  
200 205 210  
Thr Leu Thr Asp Ala Gln Lys Ala Glu Arg Leu Ala Ala Leu Gln  
215 220 225  
Gln Gln Met Pro Ala Asp Gln Arg Ala Ala Gln Gln Ala Val Asp  
230 235 240  
Arg Gln Arg Ala Ala Ile Asp Gln Ser Pro Xaa Leu Gln Lys Ser  
245 250 255  
Gly Thr Thr Pro Asp Ala Met Arg Ala Gln Leu Thr Gln Thr Leu  
260 265 270  
Gly Pro Glu Ala Ala Ala Arg Val Gly Gln Met Gln Gln Asp Asp  
275 280 285

Ala Ser Trp Gln Xaa Arg Tyr Ala Asp Tyr Ala Ala Gln Arg Ala  
290 295 300  
Gln Ile Glu Ser Ala Gly Leu Ser Pro Gln Gly Arg Asp Ala Gln  
305 310 315  
Ile Ala Ala Leu Arg Gln Arg Val Phe Thr Lys Pro Gly Glu Ala  
320 325 330  
Val Arg Ala Ala Ser Leu Asp Arg Gly Ala Gly Ser Ala Gln  
335 340

(2) SEQ ID NO:5 についての情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 2118 塩基対
- (B) 種類: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直線
- (H) 分子の型: DNA (ゲノム)
- (I) ハイボセチカル: NO
- (J) アンチセンス: NO
- (V) フラグメントの型: 内部
- (X1) 配列の詳細: SEQ ID NO: 5:

ATGCGCAGGA CGATCGCTTC CAGGCTGGTG GCAGGGGCGAG TGGCATCGCG 50  
GATGAGCATC GCGCCGTTTC GCGGGACGAC CCGGTGATG ACGCTCGCGA 100  
CGACGACGAC GCGAATGGCG GCGACGGGCG CCGCGGTGG CTACGCGCGG 150  
ACGCGTTACC CGATCATCCT CCGGACGGG CTCTCGGTA CCGACAAGTA 200  
CGCCGGCGTG CTGAGATAT GGTACGGCAT CCGGAGGAC CTGCAACAGA 250  
ACGGTGGGAC CGTCTACGTC GCGAAGCTGT CCGGTTTCCA GAGCGACGAC 300  
GGCCGGAACG GCGCGGGCGA ACAATTGCTC GGTACGTTGA AGACGGTGGT 350  
CGCGGGGACG GGGGGGACCA AGGTCAATCT CGTGGTTCAC AGCCAGGGCG 400  
GCCTCTGCTC GCGCTATGTT GCTGCGGTCG GCGCCGATCT CTTTGGCTCG 450  
GTGACGAGGA TCGGCGGAGC CGATCGCGGC TCGGAATTCG CCGACTTCGT 500

CGAGGACGTC CTGCGGTAGC ATCCGACCGG GCTTTCGTCA TCGGTGATCG 550  
CGCGCTTCGT CAATGTGTTT GGGATCCTGA CGAGCAGCAG CCACAACACC 600  
AACCAGGACG CGCTCGCGCG ACTGACAGCG CTGACCAACG CACGCGCGCG 650  
CAGGTACAA CACAATATC CGAGCGCGGG CCGTGGTGGC CCGGGCAGTT 700  
GCCAGACCGG TCGCGCGACC GAACCGGTGC GCGGACACAC GCACCTGCTG 750  
TATTCGTGGG CCGGACGGCG GATCCAGCGG ACCTCTCTCG TTTTGGGCT 800  
CACGCGCGCG ACGGACCGGA GCACCGTTCC GCTCGTGGAT CCGCGGAACG 850  
TGCTCGACCT GTGACGCTC GCGCTGTTCG GCACCGGACG GGTGATGATC 900  
AACCAGGGCT CCGGGCAGAA CGACGGGCTC GTGTGGAAT GCACTGCGCT 950  
GTACGGCAAG GTGCTGAGCA CGAGCTACAA GTGGAACGAC CTGCGAGAGA 1000  
TCAACCACTT GCTCGCGCTG CCGCGCGCGT ATCGGGAAGA TCCGCTCGCG 1050  
GTGATCGGCA CGATGCGGAA CCGGCTGAAG CTGCGGGGGG CAGGAGGAGG 1100  
ACGCGCGCGG CTGCGCGCGG GCGCGCTGCT CTATGCTGCG GTGGGGCTGG 1150  
CGGCGATTGC CCGGCTGGCG ATGTGGAGCG GCGCGGGCGG GCATGCGGGG 1200  
ACGGCGCGAT CCGGCGAGCG GCGGATGCGG TCGGCGGCGC GCGGACCGCG 1250  
TGCGGACCGG CCGGAGCGCG CCGTGGCGCG AAGCAGGAGC CTGCGCGCGT 1300  
CGGTGCGCGG CTCCAGCGCG CCGCGCTTTC CGGTGATGCG CCGCGGCGAT 1350  
GTGCGGAAGG CCGCGCGCGT GCGGATTTC TTGACTACT GCCTGACCGC 1400  
GCAGAGCGAC CTGAGTGGCG CCGGCTCTGA TCGTTCTGTC ATGCGCGAGA 1450  
TTGCGGCACA GCTCGAGCGG ACCGTTGCGG AGGCGGAGCG GCTCGAGCTG 1500  
TGGCACCGGT ATCGCGGCTA TCTGAGCGCA CTGCGGAAAT TCGCGGATGC 1550  
CGCGCGCGCT GACAAGTGGG ACCTGGGTGC ATTCAGCCTC CGGCTCGAGC 1600  
ACGCGCGCTC GATCGGCTAC CGGTGGCTCG GCGACTGGAG CCAGCGCTTC 1650  
TTGCTGCGCG AGCAATGGCG GCAGCGCTAC GACCTGCGCG GCGTGAAGAT 1700  
CGCGCAGGAC CCGCGCGTGA CGATGCGGCA GAAGCGCGAA CCGCTCGCGG 1750  
CGCTCGAACA CGAGATGCGG GCGGCGGAAC GCGCGCGGCA GCAGCGCGTC 1800  
GACCGCGAGC GCGCGCGGAT CGACGAGATC GCGCAATTGC AGAAGAGCGG 1850

GGGAGCGGCC GATGCGATGC GCGGACNACT GAGCGAGAGC CTCGCGCCCG 1900  
AAGCGGCGCG GCGGCTGCGG CAGATGACAF AGGACGACGC ATCGTGGCAG 1950  
AGCGGCTAGC CGGACTACGC GCGGACGCGT CCGGAGATCG AGTGGCGCGG 2000  
CGTGTGCGCG CAGGATGCGG ACGCGGAGAT CCGCGCGGCT CCGGAGCGCG 2050  
TGTTCAGGAA GCGCGGCGAA GCGGTGCGCG CCGCATCGCT CGATCGCGGG 2100  
GCGGGCAGCG GCGGCTAA 2118

(2) SEQ ID NO:6 についての情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 19 アミノ酸
- (B) 種類: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直線
- (H) 分子の型: ペプチド
- (I) ハイボセチカル: NO
- (J) アンチセンス: NO
- (V) フラグメントの型: 内部
- (VI) 起源:

- (A) 生物: シュードモナス セバシア
- (B) 株: DSM 3959

(X1) 配列の詳細: SEQ ID NO: 6:

Thr Ala Arg Gly Gly Arg Ala Pro Leu Arg Arg Ala Val Val Tyr  
1 5 10  
Gly Ala Val Gly

(2) SEQ ID NO:7 についての情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 19 アミノ酸
- (B) 種類: アミノ酸

特表平7-504561 (17)

(C) 鎖の数：一本鎖  
 (D) トポロジー：直鎖  
 (E) 分子の型：ペプチド  
 (F) ハイボセチカル：NO  
 (G) アンチセンス：NO  
 (V) フラグメントの型：内部  
 (vi) 起源：  
 (A) 生物：シュードモナス セバシア  
 (B) 株：DSM 3959  
 (xi) 配列の詳細：SEQ ID NO: 7:  
 Ala Arg Thr Met Arg Ser Arg Val Val Ala Gly Ala Val Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Met Ser Ile Ala

(2) SEQ ID NO:8 についての情報:

(i) 配列の特徴:  
 (A) 長さ: 17 アミノ酸  
 (B) 種類: アミノ酸  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖  
 (E) 分子の型: ペプチド  
 (F) ハイボセチカル: NO  
 (G) アンチセンス: NO  
 (V) フラグメントの型: 内部  
 (vi) 起源:  
 (A) 生物: シュードモナス セバシア  
 (B) 株: DSM 3959

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 8:  
 Ala Arg Thr Met Arg Ser Arg Val Val Ala Gly Ala Val Ala Met  
 1 5 10 15  
 Ile Ala

(2) SEQ ID NO:9 についての情報:

(i) 配列の特徴:  
 (A) 長さ: 56 塩基対  
 (B) 種類: 核酸  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖  
 (E) 分子の型: DNA (ゲノム)  
 (F) ハイボセチカル: NO  
 (G) アンチセンス: NO  
 (V) フラグメントの型: 内部

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 9:

CGCGTAAGCT TCACATTGAA AGGGGAGGAG AATCATGGCC GCTGGCTACG 50  
 CGGCGA 56

(2) SEQ ID NO:10 についての情報:

(i) 配列の特徴:  
 (A) 長さ: 56 塩基対  
 (B) 種類: 核酸  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖  
 (E) 分子の型: DNA (ゲノム)  
 (F) ハイボセチカル: NO  
 (G) アンチセンス: YES  
 (V) フラグメントの型: 内部

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 10:  
 CGCGTCGCCG CGTAGCCAGC GGCCATGATT CTCCTCCGCT TTCAATGTGA 50  
 AGCATA 56

(2) SEQ ID NO:11 についての情報:

(i) 配列の特徴:  
 (A) 長さ: 6 アミノ酸  
 (B) 種類: アミノ酸  
 (C) 鎖の数: 一本鎖  
 (D) トポロジー: 直鎖  
 (E) 分子の型: ペプチド  
 (F) ハイボセチカル: NO  
 (G) アンチセンス: NO  
 (V) フラグメントの型: N-末端  
 (vi) 起源:  
 (A) 生物: シュードモナス セバシア  
 (B) 株: DSM 3959

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 11:

Ala Ala Gly Tyr Ala Ala  
 1 5

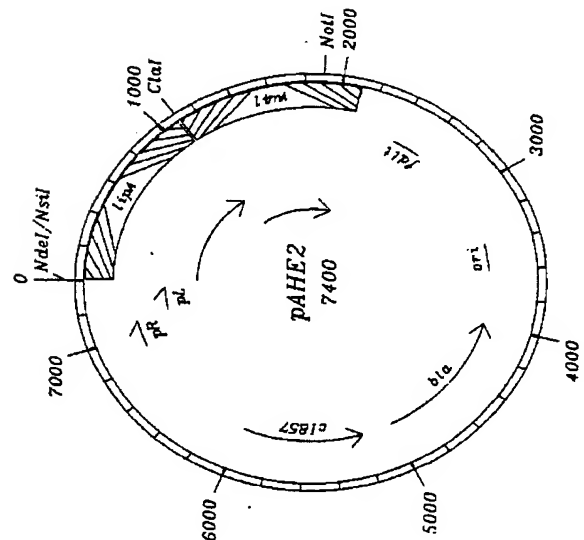


Fig. 1

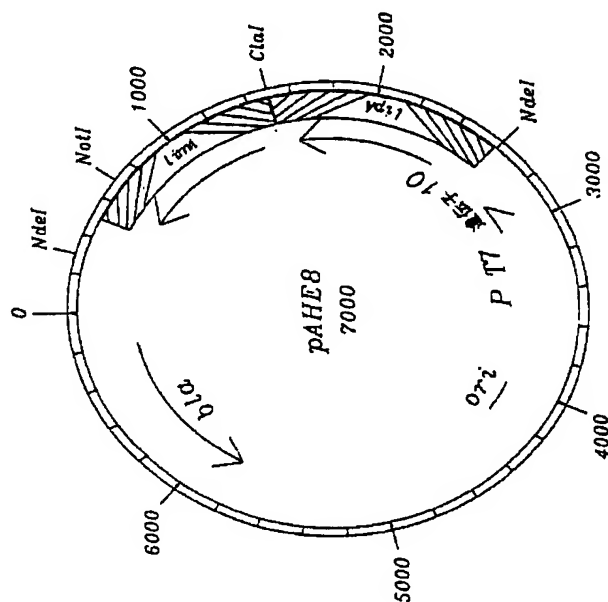


Fig. 2

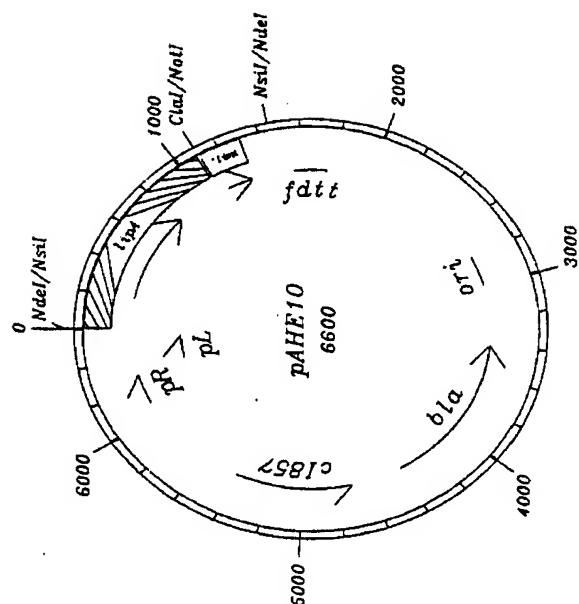


Fig. 3

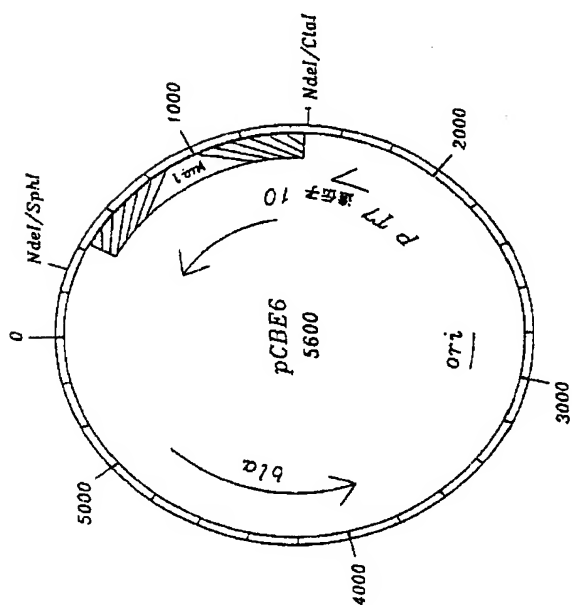


Fig. 4

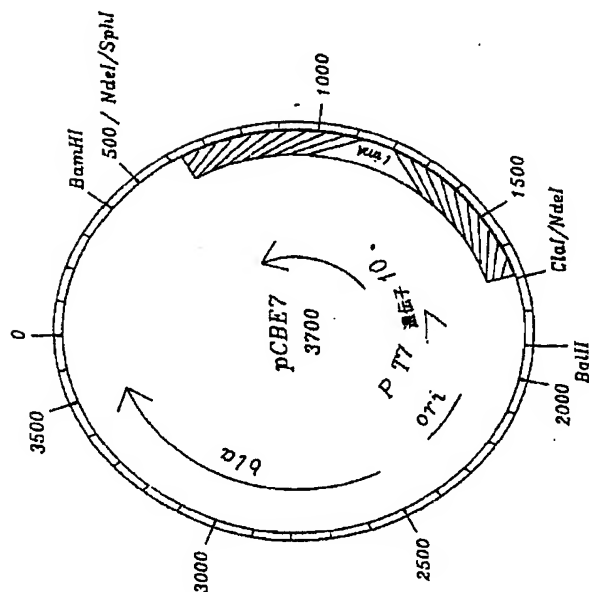


Fig. 5

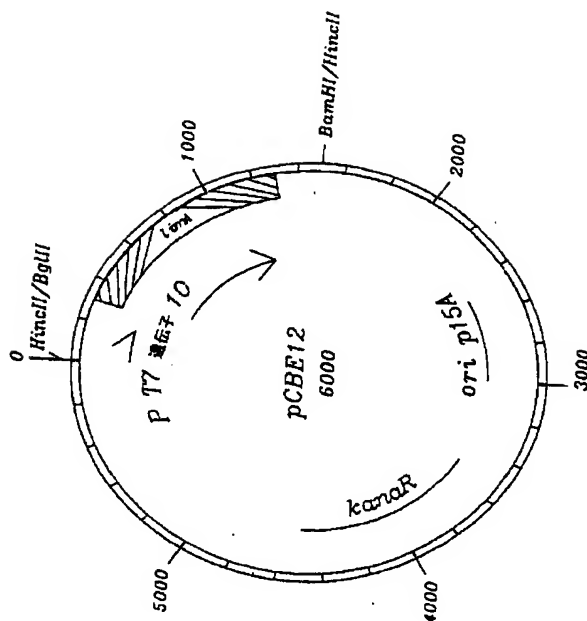


Fig. 6

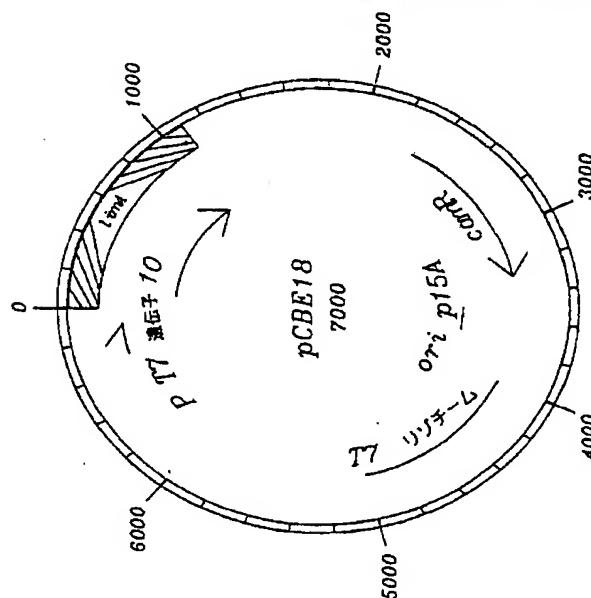


Fig. 7

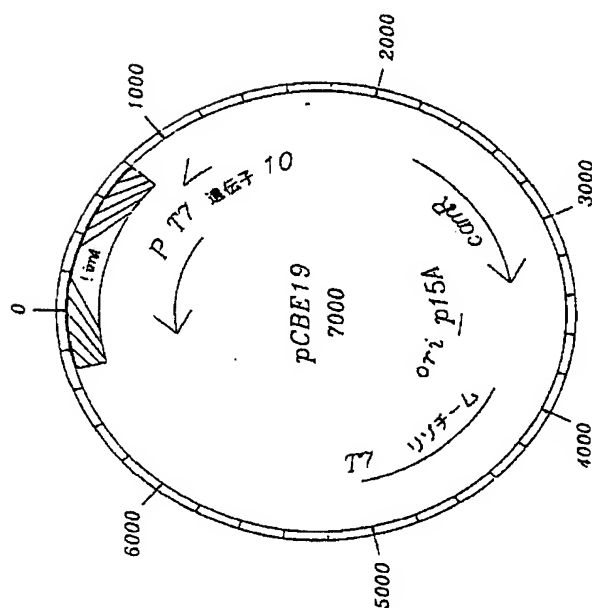


Fig. 8

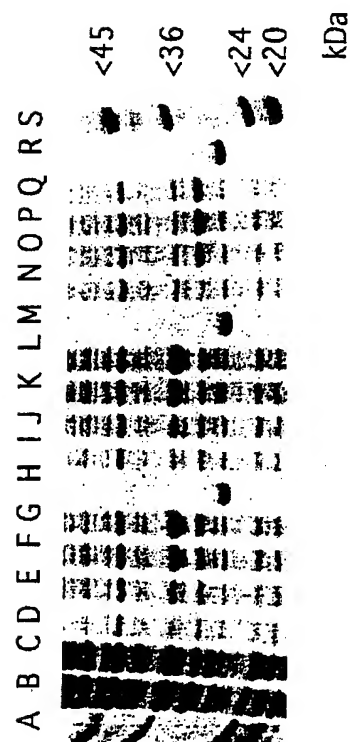


Fig. 9



Fig. 10

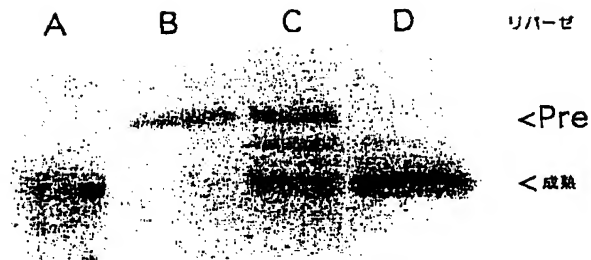


Fig. 11

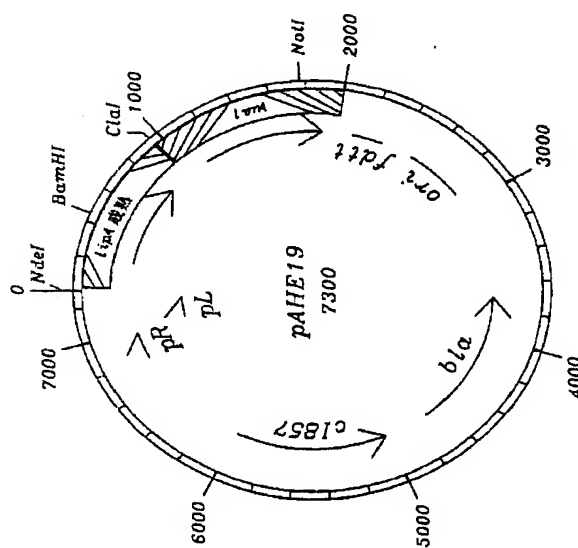


Fig. 12

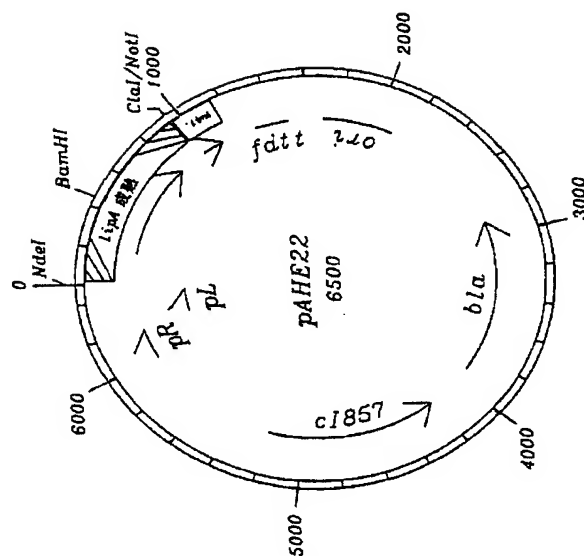


Fig. 13

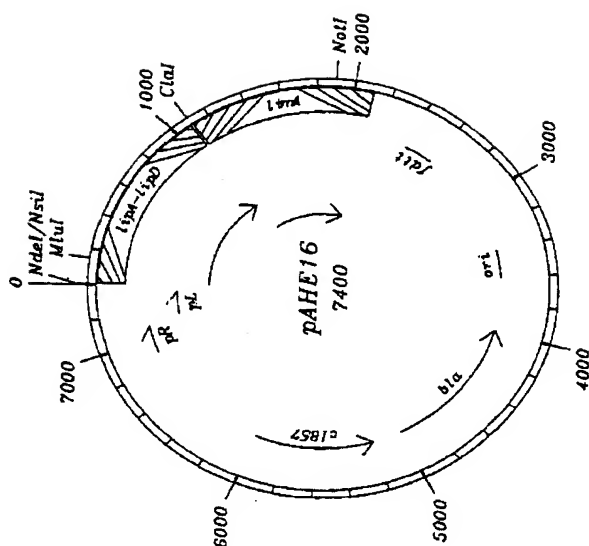
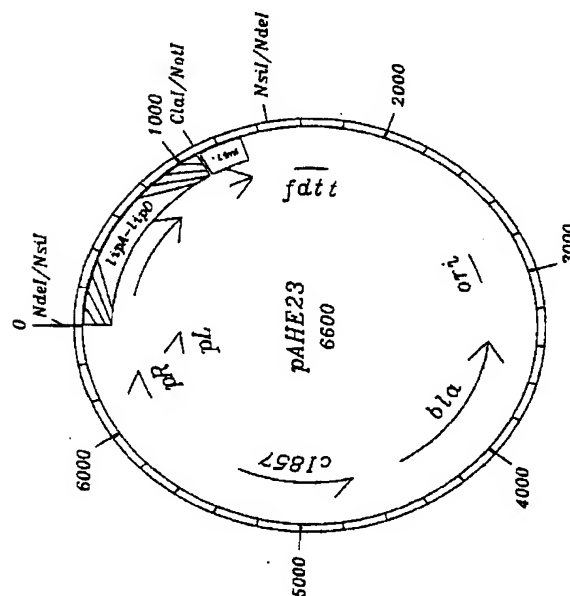


Fig. 14



**Fig. 15**

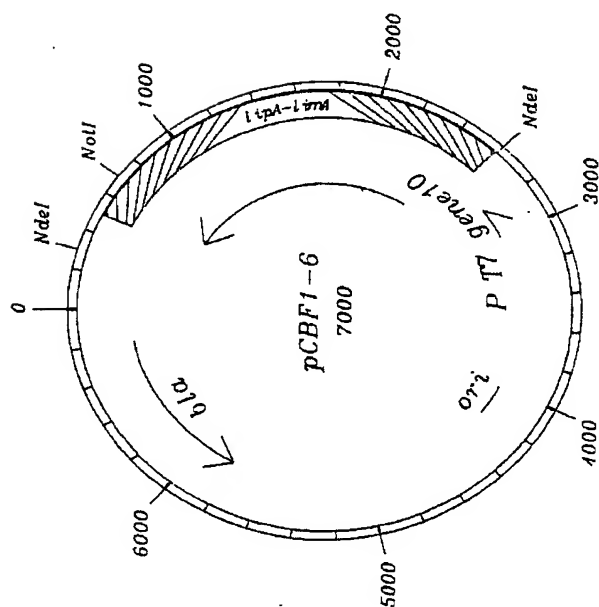


Fig. 16

補正書の翻訳文提出書  
(特許法第184条のB)

平成6年 6月 20日

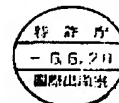
特許庁長官 麻 生 渡 殿

- 1 特許出願の表示  
PCT/DK92/00391
- 2 発明の名称  
リバーゼの製造のための方法
- 3 特許出願人

住所 デンマーク国、デーコー2880 バグスバエルト、  
ノボ アレ (番地なし)  
名称 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカフ

- 4 代 理 人
- 住 所 千105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号  
静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所  
電話 (3504) 0721
- 氏 名 弁護士 (7751) 石 田 敬

- 5 補正書の提出年月日  
1994年3月25日
- 6 添付書類の目録  
補正書の翻訳文



1 週

示する。

W091/00908号は、宿主細胞の中で発現されるポリペプチドによる異種宿主細胞におけるシュードモナス セバシア リパーゼの生産を調示しており、そのポリペプチドはリパーゼ生産の調節因子として働いている。

#### 発明の概要

驚くべきことに、組織宿主細胞により生産される活性リパーゼ酵素の収率は、その細胞から回収されたリパーゼを産性、それに続くシャペロン (chaperone) 分子の存在下での再生に付したときに高めることが可能であることが見出された。

従って、本発明はインビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための方法に関連し、この方法は

(a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリパーゼが不活性又は部分的に活性な状態で生産されるのに適する条件のもとで培養し、その培養物からこのリパーゼ酵素を回収し、次いでその回収されたリパーゼ酵素を産性に付する、

(b) この産性したリパーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして

(c) 工程 (b) の混合物を再生に付して、活性リパーゼ酵素を生産すること、

を含んで成る。

他方、本発明はインビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための方法に関連し、この方法は

(a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリパーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で

スホアミジット法により合成的に製造することもできる。ホスホアミジット法に従うと、オリゴヌクレオチドを例えば自動DNA合成装置で合成し、精製、リゲートして適宜のベクターの中にクローニングする。

最後に、このDNA構築体は合成とゲノムとの複合物、合成とcDNAとの複合物、又はゲノムとcDNAとの複合物であって、合成、ゲノム又はcDNA起源のフラグメント (適宜) を、この全DNA構築体の様々な部分に対応するフラグメントに、標準の技術に従ってリゲートすることによって製造したものでありうる。

本発明のDNA構築体において、リパーゼ構築体をエンコードするDNA配列はシュードモナス種又はクロモバクター種に由来するものであってよい。例えば、前記第一DNA配列は、シュードモナス セバシア、シュードモナス フラギ、シュードモナス グラジオリ、シュードモナス アルオレセン、シュードモナス スタツツエリ、シュードモナス アルカリゲンス、シュードモナス シュードアルカリゲンス、シュードモナス プチダ、シュードモナス グルメ、シュードモナス アエルギノーズもしくはクロモバクター ビスコス リパーゼ、又は上記のリパーゼ酵素の誘導体をエンコードするものでありうる。前記第二DNA配列は、シュードモナス セバシア リパーゼ調節因子、シュードモナス グルメ リパーゼ調節因子、シュードモナス アエルギノーズ リパーゼ調節因子、もしくはその他のシュードモナス リパーゼ調節因子タンパク質、又は任意のこれらの調節因子の誘導体をエンコードするものでありうる。最も好ましくは、この第一DNA配列はシュードモナス セバシア リパーゼ又はその誘導体をエンコードし、そして第二DNA配列は引用することで本明細書に組入れるW091/00908号に記載のシュードモナス セバシア リパーゼ調節因子又はそれらの誘導体をエンコー

ドする。

本発明に従うと、シャペロン分子はシュードモナス リパーゼ調節タンパク質、好ましくはシュードモナス セバシア リパーゼ調節因子 (W091/00908号に開示)、シュードモナス グルメ リパーゼ調節因子及びシュードモナス アエルギノーズ リパーゼ調節因子より成る群から選ばれるもの、又は任意のかかるリパーゼ調節因子の誘導体であることが好都合である。

本明細書において、リパーゼ調節因子の誘導体は、リパーゼ酵素の誘導体に関して上記したのと同じ状況である、即ち、前記の通りに、天然リパーゼ調節因子についてコードするDNA配列を適宜改変することにより天然リパーゼから誘導されたシャペロン活性を有するタンパク質であると理解される。この誘導体のシャペロン活性は、例えば本明細書に記載の通り、活性リパーゼ酵素の生産におけるその誘導体の能力の分析により決定される。

本発明にかかる方法の好適な態様において、リパーゼ酵素はシュードモナス セバシア リパーゼ又はその誘導体であり、そしてシャペロン分子はシュードモナス セバシア リパーゼ調節因子 (又はその誘導体) でありうる (共に、W091/00908号に開示)。

リパーゼ酵素及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列を含んで成る本発明のDNA構築体はゲノム又はcDNA起源であってよく、例えば適当な生物のゲノム又はcDNAライブラリーを用意し、そしてリパーゼ又はシャペロンの全体又は一部をコードするDNA配列を、標準の技術に従う (Sambrookら、1989を参照のこと) 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるハイブリダイゼーションによりスクリーニングすることによって得られるものである。

本発明のDNA構築体は確立されている標準的な方法、例えばS. L. Benacerrafら (1981)、Hatchonら (1984) により述べられているホ

プラスミドpCBE7 (図5) は、同じ1.2 kbのClnI-SphIフラグメントを発現ベクターpT7-7にサブクローニングすることによって構築した。E103はpCBE7で形質転換されたBL21 (DE3) pLys Sである。E102及びE103の誘発により、約32KDの分子量のタンパク質が観察された。

プラスミドpCBE12 (図6) は、pCBE7のBgl II-BamHIフラグメントをpACYC177にサブクローニングすることによって構築した。Lim は、pSJ518 (W091/00908のFig. 3に記載) から発現されたリパーゼに対してトランスにおいてpCBE12から発現し、そしてpARE10はリパーゼ活性をもたらした。

プラスミドpCBE18及び19 (図7及び8) は、pCBE7のBgl II-BamHIフラグメントをpLys SのBcl I部位にサブクローニングすることによって構築した。Lim はpARE10由来のリパーゼに対してトランスでpCBE18及び19から発現し、リパーゼ活性をもたらした。

#### 例3

高レベルのタンパク質発現を得るための増殖/誘発実験

下記の通りに培養物を誘発せしめて高レベルのLimA及びLimBの両者を生成せしめた。大腸菌株E57 (JA221/pARE2) 及びE68 (JA221/pARE10) を30℃で250 rpm にて一夜増殖させた。その培養物を1:100に希釈し、そしてA600が0.5となるまで30℃、250 rpm で増殖させた。次にその培養物を42℃で増殖するようにした。大腸菌株E102 (BL21 (DE3) pLys S/pCBE6) は37℃で一夜増殖させ、1:100に希釈し、そしてA600が0.5となるまで増殖させた。次いでIPTGをこの培養物に1.5 mMの最終濃度となるまで加えた。15分後、リファンピシンを最終濃度100 µg/mlとなるまで加えた。その培養物を37℃でインキュベートし、且つその増殖中250 rpm で振った。各培養物を誘発の60、90及び120分目において取った。



再生実験中でのLipAによる、P<sub>2</sub>セバシア由来のアレリバーゼではなくリバーゼの活性化は、大腸菌の中で生産されたリバーゼタンパク質を利用した結果と一致した。大腸菌リバーゼサンプルは約5%の成熟タンパク質及び95%のアレリバーゼより成る。変性前(pARE2のみ)及び再生後(pARE2及びpARE10)に観察されたリバーゼ活性の値は、SDS-PAGEで認められたリバーゼタンパク質の総量より予測される値のほぼ5%に相当した。

## 例8

成熟LipAタンパク質の発現のための構築

シグナルペプチドを欠く形態、即ち成熟リバーゼとしてリバーゼLipAが発現されるプラスミドを構築した。これらは成熟リバーゼをエンコードするlipA遺伝子の改変バージョン、それに続くlipA遺伝子を含むpARE19(図12)、及びlipA抜きの成熟リバーゼをエンコードするpARE22(図13)である。それらは下記の通りに構築した：

下記のDNAフラグメントを合成した(標準方法)：

(MluI) (HindIII)

5' - CGCGTAACCTTCACATTTGAAGGGGAGGAGCAATCATGGCC -

3' - ATTGGAATGTAACTTTCCCTCCCTCTTACTACCGG -

(HindIII)

GCTGGCTACGGCGCGA - 3' (SEQ ID NO 9)

CGACCGATGCGCGCGCTGGCC - 5' (SEQ ID NO 10)

このDNAフラグメントは基本的には、バチルス リジニエニホルミス amyLリボソーム結合部位及び開始コドン、成熟LipAタンパク質のN末端由来のアミノ酸ANGYAA (SEQ ID NO 11) をエンコードする配列の前に含む。

このDNAフラグメントを、MluI消化pSJ420 (NO91/00908に記載のpSJ416と同一) にリゲートし、そしてpSJ838をプラスミドとして単

pARE19：成熟LipA, LipA,

pARE22：成熟LipA,

	変性前のLU	変性後のLU
pARE19(100 μl)	0.5	0.5
pARE19(100 μl) + LipA (10 μl)	0.5	0.5
pARE19(100 μl) + LipA (20 μl)	0.5	0.75
pARE19(100 μl) + LipA (30 μl)	0.5	0.75
pARE19(100 μl) + 無-LipA リゼート (30 μl)	0.5	0.25
pARE22(100 μl)	0.0	0.0
pARE22(100 μl) + LipA (10 μl)	0.0	0.5
pARE22(100 μl) + LipA (20 μl)	0.0	0.75
pARE22(100 μl) + LipA (30 μl)	0.0	0.75
pARE22(100 μl) + 無-LipA リゼート (30 μl)	0.0	0.0

## 例10

P<sub>2</sub>セバシアDSH 3401からのlipD及びlipDのクローニング及び配列決定75-10Aとも呼んでいるP<sub>2</sub>セバシア、DSH 3401の別の単離体は、DSH 3959由来のLipAに類似なリバーゼを生産する。

DSH 3401由来のリバーゼエンコードDNAのクローニング及び配列決定 (NO91/00908に記載の標準方法を採用) は、lipA及びlipAに対して比較的高い相同性を有する以降lipD及びlipDと呼ぶ二本の遺伝子を示した。

極端なDNAのGC含有に基づき、その配列は決定することが困難であり、従っていまだに部分的に未決定な配列が残っているlipD遺伝子における4位、及びlipD遺伝子における2箇所の位置。

lipD開始コドンは、lipA及びlipAの場合のように、lipD停止コド

国際調査報告		International application No. PCT/JP 92/00391
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC5: C12N 9/20, C12N 15/67, C12N 15/55, C12N 15/62 According to international patent classification (IPC) as to technical classification and IPC		
B. FIELD SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC5: C12N		
Documentation searched other than international documentation is the extent that such documents are included in the field searched		
SE, DK, FI, NO classes as above		
Abstracts have been searched during the international search (name of field and, where practicable, search terms used)		
WPI, CA, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Class of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, K	EP, A1, 0464822 (UNILEVER NV ET AL.), 8 January 1992 (08.01.92), see page 3 lines 14-23, page 4 lines 15-26	5-14, 18-30
X	Journal of Bacteriology, Volume 173, No. 2, January 1991, Steen Jorgensen et al., "Cloning, Sequence, and Expression of a Lipase Gene from Pseudomonas aeruginosa: Lipase Production in Heterologous Hosts Requires Two Pseudomonas Genes", see discussion pages 505-506	5-14, 18-30
X	WO, A1, 100908 (NOVO MONDISK A/S), 24 January 1991 (24.01.91), see page 3 lines 16-21 and the claims	5-14, 18-30
A	--	1-4, 15-17
Further documents are listed in the conclusion of Box C.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>* Further documents are listed in the conclusion of Box C.</p> <p>"A" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"B" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"C" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"D" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"E" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"F" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"G" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"H" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"I" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"J" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"K" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"L" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"M" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"N" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"O" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"P" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"Q" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"R" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"S" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"T" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"U" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"V" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"W" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"X" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"Y" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"Z" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> </div> <div> <p>"A" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"B" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"C" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"D" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"E" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"F" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"G" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"H" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"I" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"J" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"K" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"L" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"M" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"N" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"O" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"P" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"Q" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"R" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"S" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"T" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"U" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"V" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"W" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"X" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"Y" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> <p>"Z" documents referred to in the abstract of the international search report are not included in the field searched.</p> </div> </div>		
Date of filing of the international search report		05-04-1992
Name and mailing address of the ISA:		Authorize officer
Swedish Patent Office Box 5051, S-102 02 STOCKHOLM Telephone No. +46 8 666 02 31		Yvonne Sjöström Telephone No. +46 8 792 25 00

Form PCT/ISA.2 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告		International application No. PCT/JP 92/00391
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Class of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, A2, 0331376 (AMANO PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 6 Sept. 1989 (06.09.89)	1-30
A	Chemical Abstracts, Volume 111, No. 21, 20 November 1989 (20.11.89), (Columbus, Ohio, USA), Ellis R. John et al., "Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures", page 256, THE ABSTRACT No. 149047r, Trends Biochem. Sci. (Pers. Ed.) 1989, 14 (8), 339-342, (a)	1-30

Form PCT/ISA.2 (second sheet) (July 1992)

国際特許報告		International application No.	
26/02/93		PCT/DK 92/00391	
Patent document date of national report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
EP-A1- 0464922	06/01/92	CA-A- 2946249	07/01/92
WO-A1- 100908	24/01/91	NO-91- 100908	
EP-A2- 0311376	06/09/89	JP-A- 3967187	11/04/91

Form PCT/ISA 318 (latest form) (July 1991)

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I  
 C 1 2 P 19/38 7432 -4B  
 //(C 1 2 N 15/09 Z N A  
 C 1 2 R 1:07)  
 (C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 R 1:19)  
 (C 1 2 N 9/20  
 C 1 2 R 1:38)

C 1 2 R 1:07)

(72) 発明者 バックレイ, キャサリン エム.  
 アイルランド国, コーク 4, ボーラドフ  
 ロード, ランズケーブ パーク "タ  
 ラ" (番地なし)

(72) 発明者 ホブソン, オードリー  
 アイルランド国, ウィックロウ, アボカ,  
 キルマジグハウス (番地なし)  
 (72) 発明者 マッコンネル, デビッド ジェイ.  
 アイルランド国, ダブリン, ブラックロッ  
 ク, グローブ ロウン 31